

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Dpto. BIOLOGÍA



Uso potencial del Factor de Crecimiento del Hígado (LGF) y células madre de cordón umbilical en el tratamiento de las ataxias cerebelosas

TESIS DOCTORAL

Lucía Calatrava Ferreras

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Dpto. BIOLOGÍA



Uso potencial del Factor de Crecimiento del Hígado (LGF) y células madre de cordón umbilical en el tratamiento de las ataxias cerebelosas

Memoria de la Tesis para optar al grado de doctor presentada por la
Licenciada en Biología:

Lucía Calatrava Ferreras

Directores de la Tesis:

Dra. Eulalia Bazán Izquierdo

Dr. Antonio Sánchez Herranz

Servicio de Neurobiología-Investigación
Hospital Universitario Ramón y Cajal
Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS)

HOSPITAL RAMON Y CAJAL
Laboratorio de Neurobiología de las Células Madre
Servicio de Neurobiología
Departamento de Investigación

Carretera de Colmenar, Km 9.1
28034 Madrid, España
Tfno: +34-91-336-8384
Fax: +34-91-336-9016

Los Drs. Eulalia Bazán Izquierdo y Antonio Sánchez Herranz, facultativos del Servicios de Neurobiología-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal, como directores del trabajo de investigación de la Tesis Doctoral: “Uso potencial del Factor de Crecimiento del Hígado (LGF) y células madre de cordón umbilical en el tratamiento de las ataxias cerebelosas” realizada en el Laboratorio de Neurobiología de las Células Madre del servicio de Neurobiología-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

CERTIFICAN:

Que este estudio experimental llevado a cabo por Lucía Calatrava Ferreras es satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Biología en la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

Dra. Eulalia Bazán Izquierdo
e-mail: eulalia.bazan@hrc.es

Dr. Antonio Sánchez Herranz
e-mail: antonio.sanchez@hrc.es

Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Neurobiología de las Células Madre del Servicio de Neurobiología-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal gracias a una beca predoctoral otorgada por la Agencia Pedro Laín Entralgo (NDG 09/7) y a los apoyos económicos de los proyectos FIBio-HRC (2012/0085) y (2014/0020).

ÍNDICE.

RESUMEN.	Pág. 11
-----------------	---------

ABREVIATURAS.	Pág. 15
----------------------	---------

INTRODUCCIÓN.

1. ATAXIAS CEREBELOSAS.	Pág. 19
1.1. Definición y aspectos generales.	Pág. 19
1.2. El cerebelo. Estudio y funcionamiento.	Pág. 20
1.3. Diagnóstico y Clasificación.	Pág. 23
1.4. Ataxia de Friedreich.	Pág. 27
1.4.1. Cuadro clínico.	Pág. 27
1.4.2. Anatomía Patológica.	Pág. 28
1.4.3. Frataxina	Pág. 29
1.5. Tratamientos actuales.	Pág. 29
1.6. Modelo experimental de ataxia cerebelosa inducido por la neurotoxina 3-acetilpiridina (3-AP).	Pág. 33
1.7. Modelos experimentales genéticos de ataxia.	Pág. 34
2. TRATAMIENTO CON FACTORES TRÓFICOS EN ATAXIA.	Pág. 37
2.1. Factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales (GDNF).	Pág. 38
2.2. Factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I).	Pág. 39
3. FACTOR DE CRECIMIENTO DEL HÍGADO (LGF).	Pág. 41
3.1. Naturaleza química del LGF.	Pág. 41
3.2. Efectos biológicos del LGF.	Pág. 42
4. TERAPIA CELULAR EN ATAXIA.	Pág. 46
4.1. Células Madre de Cordón Umbilical (CMCU).	Pág. 47

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	Pág. 53
MATERIAL Y MÉTODOS.	
1. REACTIVOS.	Pág. 57
1.1. Reactivos de uso general.	Pág. 57
1.2. Reactivos para histología.	Pág. 57
1.3. Reactivos para bioquímica.	Pág. 58
2. MODELOS EXPERIMENTALES.	Pág. 59
2.1. Modelo Experimental de ataxia cerebelosa.	Pág. 59
2.2. Modelo experimental ataxia de Friedreich. Fxn ^{tm1Mkn} / Tg(FXN)YG8Pook.	Pág. 59
3. PURIFICACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL HÍGADO (LGF).	Pág. 60
4. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO (CMCUhu).	Pág. 61
4.1 Valoración, procesamiento y caracterización de las CMCUhu.	Pág. 61
4.2 Aislamiento de CMCUhu del concentrado de células sanguíneas.	Pág. 61
5. ADMINISTRACIÓN DE LGF E IMPLANTES CELULARES.	Pág. 62
5.1 Administración intraperitoneal de LGF en el modelo de lesión con 3-AP.	Pág. 62
5.2 Administración intraperitoneal de LGF en el modelo YG8R.	Pág. 63
5.3 Administración intravenosa de CMCUhu en el modelo de lesión con 3-AP.	Pág. 64
6. ESTUDIO DE COMPORTAMIENTO.	Pág. 65
7. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.	Pág. 66
8. HISTOLOGÍA.	Pág. 66
8.1 Procesamiento del tejido.	Pág. 66
8.2 Inmunohistoquímica.	Pág. 67

8.2.1 Anticuerpos.	Pág. 67
8.2.1 Técnica inmunohistoquímica.	Pág. 68
8.3 Tinción con FluoroJade B para la detección de neuronas en degeneración.	Pág. 69
8.4 Análisis Morfométrico.	Pág. 70
8.4.1 Análisis morfométrico para la cuantificación de neuronas en la oliva inferior y en los núcleos profundos del cerebelo de ratas atáxicas.	Pág. 70
8.4.2 Análisis morfométrico para la cuantificación de neuronas y células de microglía de la médula espinal de los ratones YG8R.	Pág. 72
 9. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.	 Pág. 72
9.1 Preparación de extractos tisulares.	Pág. 72
9.1.1 Disección del tejido.	Pág. 72
9.1.2 Procesado del tejido.	Pág. 72
9.2 Determinación de la concentración de proteínas.	Pág. 73
9.3 Técnicas de separación y análisis de proteínas (Western blot).	Pág. 73
9.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	Pág. 73
9.3.2 Transferencia a membrana.	Pág. 74
9.3.3 Inmunodetección.	Pág. 74
9.3.4 Revelado por quimioluminiscencia.	Pág. 75
9.3.5 Revelado del control de carga con fosfatasa alcalina.	Pág. 76
9.3.6 Re-inmunodetección.	Pág. 76
9.3.7 Análisis densitométrico.	Pág. 77
 10. ANÁLISIS CONCENTRACION GLUTATION EN MUSCULO.	 Pág. 77
 11. MICRODIALISIS.	 Pág. 78
11.1 Reactivos y materiales.	Pág. 78
11.2 Animales y procedimiento quirúrgico.	Pág. 78
11.3 Microdiálisis.	Pág. 79
11.3 Método de determinación de aminoácidos neurotransmisores por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).	Pág. 81

12. ESTUDIO DEL MÚSCULO CARDIACO EN LOS RATONES YG8R.	Pág. 82
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.	Pág. 82

RESULTADOS

1- PUESTA A PUNTO Y CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE ATAXIA CEREBELOSA INDUCIDO POR LA NEUROTOXINA 3-AP.	Pág. 85
1.1- Efecto de la inyección intraperitoneal (i.p.) de 3-AP sobre la conducta motora y el número de neuronas de la oliva inferior.	Pág. 85
1.2- Efecto de la inyección i.p. de 40 mg/kg de 3-AP sobre la proliferación de la microglía en la oliva inferior.	Pág. 88
1.3- Efecto de la inyección i.p. de 40 mg/kg de 3-AP sobre marcadores de la función cerebelosa.	Pág. 90
2- ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE LGF EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE ATAXIA CEREBELOSA INDUCIDO POR 3-AP.	Pág. 93
2.1- El tratamiento con LGF estabiliza el comportamiento motor en ratas con lesión de la oliva inferior promovida por 3-AP.	Pág. 93
2.2- El factor de crecimiento de hígado promueve la supervivencia celular en el tronco del encéfalo.	Pág. 94
2.3- La administración intraperitoneal de LGF previene la disminución en calbindina y el incremento de OX6 en el cerebelo provocado por 3-AP.	Pág. 96
2.4- El tratamiento con LGF modula la concentración extracelular de Glutamato y GABA en la corteza cerebelosa de las ratas lesionadas con 3-AP.	Pág. 99
3- EFECTOS DEL LGF EN EL MODELO MURINO DE ATAXIA DE FRIEDREICH YG8R.	Pág. 101
3.1- Efecto del tratamiento con LGF sobre la coordinación motora y el peso corporal de los ratones YG8R.	Pág. 101
3.2- Efecto del tratamiento con LGF sobre la expresión de marcadores neuronales y gliales en ratones YG8R.	Pág. 103

3.3- Efecto del tratamiento con LGF sobre la función cardíaca en los ratones YG8R.	Pág. 105
3.4- Efecto del tratamiento con LGF en la expresión de Frataxina y Ferroportina en el SNC y corazón de los ratones YG8R.	Pág. 107
3.5- Efecto del LGF sobre la expresión de proteínas implicadas en la supervivencia celular y el complejo IV de la cadena mitocondrial en el SNC y corazón de los ratones YG8R.	Pág. 109
3.6- Efecto del LGF sobre los niveles de Glutación en el músculo esquelético.	Pág. 110
 4-TRATAMIENTO CON CMCUhu EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE ATAXIA CEREBELOSA INDUCIDO POR 3-AP.	 Pág. 112
4.1- El implante de CMCUhu mejora la coordinación motora en ratas lesionadas con 3-AP.	Pág. 112
4.2- Detección de CMCUhu en tronco del encéfalo y cerebelo de ratas lesionadas con 3-AP.	Pág. 113
4.3- Las CMCUhu previenen parcialmente la pérdida neuronal en el tronco del encéfalo generada por la neurotoxina 3-AP.	Pág. 114
4.4- Las CMCUhu modulan la reactividad glial en las ratas lesionadas con 3-AP.	Pág. 115
4.5- El implante de CMCUhu estimulan la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl2 y la fosforilación de Akt.	Pág. 118

DISCUSIÓN

1- ACCIÓN NEUROPROTECTORA DEL LGF EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE ATAXIA CEREBELOSA.	Pág. 123
2- EFECTO NEUROPROTECTOR Y ANTIOXIDANTE DEL LGF EN EL MODELO MURINO YG8R.	Pág. 128
3- EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE CMCUhu EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE ATAXIA CEREBELOSA.	Pág. 134

CONCLUSIONES

Pág. 141

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Pág. 145

Resumen

RESUMEN

Las ataxias cerebelosas son un grupo heterogéneo e infrecuente de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la falta de coordinación motora. Su causa se atribuye a alteraciones en el cerebelo y en los circuitos asociados. La ataxia de Friedreich (AF) es el tipo más común y conocido dentro de las ataxias hereditarias. Las terapias actuales están basadas en el uso de compuestos químicos que corrigen alguno de los procesos involucrados en su patogénesis aunque todavía no existe una terapia efectiva para este tipo de enfermedades.

Los factores neurotróficos son compuestos que aumentan la supervivencia y diferenciación de determinados tipos de neuronas y, por tanto, son considerados como agentes terapéuticos muy prometedores en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. El factor de crecimiento de hígado (LGF) es un mitógeno hepático con demostrada actividad neurotrófica y/o neurogénica en el Sistema Nervioso Central dañado. Es por ello que quisimos investigar el potencial terapéutico del LGF en un modelo experimental de ataxia cerebelosa inducido por la neurotoxina 3-acetilpiridina (3-AP) y en un modelo murino de ataxia de Friedreich (AF).

Por otro lado, como terapia alternativa en el tratamiento de las ataxias, abordamos la estrategia de reemplazo celular utilizando células madre de cordón umbilical humano (CMCUhu). Estas células se han utilizado en diversos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas, mostrando resultados muy alentadores.

El tratamiento con LGF (5µg/rata) de las ratas lesionadas con 3-AP, estimuló la expresión del marcador neuronal NeuN y de la proteína antiapoptótica Bcl2 en el tronco del encéfalo. En el cerebelo, el LGF redujo la concentración extracelular de glutamato y previno la activación de la microglia. Ambos eventos podrían explicar el efecto beneficioso que el LGF ejerció sobre los terminales calbindina-positivos de las células de Purkinje (CP) que proyectan sobre los núcleos profundos. Además, el tratamiento con el factor moduló la liberación de GABA en el cerebelo, lo que podría explicar la estabilización de la coordinación motora observada en las ratas atáxicas.

En el modelo de AF en ratón utilizado (YG8R), el LGF (1,7µg/ratón) promovió la supervivencia de las neuronas sensitivas del asta dorsal de la médula lumbar y mejoró la hipertrofia cardíaca. El tratamiento con el factor también potenció la expresión de frataxina en la médula espinal, el tronco del encéfalo y el corazón. En el músculo

esquelético redujo significativamente la proporción entre glutatión oxidado/glutatión reducido, que es un indicador de estrés oxidativo. Además, reguló al alza la expresión del complejo IV (CIV) de la cadena mitocondrial en la médula espinal y el corazón de los ratones YG8R, lo que podría explicar en parte los efectos beneficiosos del LGF observados, ya que un incremento en el CIV podría reducir la concentración de radicales libres en las neuronas y los cardiomiocitos.

En el modelo experimental de ataxia cerebelosa inducido por 3-AP, las CMCUhu administradas intravenosamente alcanzaron el cerebelo y el tronco del encéfalo que son las dos estructuras del SNC más afectadas en este modelo de ataxia. Los implantes redujeron la pérdida neuronal inducida por la 3-AP en el tronco del encéfalo e impidieron la sobreexpresión de GFAP en el cerebelo. Además, las CMCUhu incrementaron la expresión de proteínas críticas para la supervivencia celular como P-Akt y Bcl-2 en el cerebelo y tronco del encéfalo de las ratas atáxicas. Todos estos efectos fueron acompañados por una mejora temporal pero significativa en la coordinación motora.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, proponemos tanto al LGF como a los implantes de CMCUhu como potenciales agentes terapéuticos en el tratamiento de las ataxias cerebelosas.

Abreviaturas

3-AP	Neurotoxina 3-acetilpiridina/Ratas lesionadas con 3-AP
3-AP+LGF	Ratas lesionadas con 3-AP que reciben tratamiento con LGF
3-AP+CMCUhu	Ratas lesionadas con 3-AP que reciben tratamiento con CMCUhu
AF	Ataxia de Friedreich
Akt	Proteína quinasa B
CG	Capa granulosa de la corteza cerebelosa
CM	Capa molecular de la corteza cerebelosa
CP	Células de Purkinje
Bax	Proteína X asociada a Bcl2
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BrdU	Bromodeoxiuridina
CIV	Complejo IV/Citocromo oxidasa
CMCUhu	Células madre de cordón umbilical humano
CME	Células madre embrionarias
CMN	Células madre neurales
DCX	Doblecortina
EEM	Error estándar de la media
FPN	Ferroportina
FXN	Frataxina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GDNF	Factor neurotrófico derivado de líneas gliales
GFAP	Proteína ácida fibrilar de la glía
GLU	Glutamato
GLUR 1	Receptor 1 del Glutamato
GLUT-5	Transportador de glucosa 5
GSH	Glutación reducido
GSSH	Glutación oxidado
HLA-ABC	Antígeno leucocitario humano

HPLC	Cromatografía de alta eficacia
IB4	Isolectina B4
IGF-I	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IP	Intraperitoneal
LGF	<i>Liver Growth Factor</i> / Factor de crecimiento del Hígado
NeuN	Proteína del núcleo neuronal
OAD	Oliva accesoria dorsal
OAM	Oliva accesoria medial
OP	Oliva principal
OX6	Clon que genera anticuerpos frente al complejo mayor de histocompatibilidad clase II
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
RIP	Anticuerpo frente a oligodendrocitos (antígeno desconocido)
SNC	Sistema Nervioso Central
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
WT	Ratones <i>wild type</i>
YG8R	Ratones Fxn ^{tm1Mkn} /Tg(FXN)YG8Pook
YG8R+LGF	Ratones YG8R que reciben tratamiento con LGF

Introducción

1. ATAXIAS CEREBELOSAS.

1.1. Definición y aspectos generales.

Las ataxias cerebelosas comprenden un amplio espectro de trastornos neurológicos que presentan como característica principal la ataxia.

Ataxia, literalmente significa descoordinación y es un síntoma clínico. Este término se ha utilizado para englobar distintas enfermedades en que la descoordinación motora es el síntoma principal.

Esta descoordinación esta originada por una degeneración cerebelosa progresiva provocada por lesiones del cerebelo o por una combinación de lesiones cerebelosas y extracerebelosas, principalmente de las aferencias procedentes de la médula espinal y del tronco del encéfalo.

Como resultado se ha descrito una sintomatología variada que combina un deterioro del equilibrio, del modo de andar, de la coordinación de los movimientos de las extremidades y temblor cinético. Estos síntomas los origina una musculatura tensa y rígida (espasticidad), contracciones involuntarias musculares (disonía), movimientos involuntarios (mioclonía) y lentitud de movimientos (bradicinesia). Además, acaban afectando a los sentidos, mostrando también alteración en la articulación de las palabras (disartria) y déficits oculomotores (nistagmo) (Marmolino y Manto, 2010).

También se han asociado las lesiones cerebelosas con diversas patologías neuropsiquiátricas como la depresión, la esquizofrenia y el autismo (Fatemi y cols., 2008). Las ataxias cerebelosas pueden ser hereditarias (identificadas por su edad de aparición, la degeneración crónica y la historia familiar)(Sailer y Houlden, 2012) y no hereditarias producidas por disfunciones vasculares, tumores, desmielinizaciones, toxinas y enfermedades infecciosas (Marmolino y Manto, 2010). Esta heterogeneidad hace difícil su caracterización y diagnóstico.

A día de hoy, no existe un tratamiento eficaz. De ahí la importancia de la investigación tanto en los tratamientos para mejorar la patología característica de este grupo de enfermedades, como en la búsqueda de modelos experimentales que simulen los distintos tipos de ataxia.

1.2. El cerebelo. Estudio y funcionamiento.

El cerebelo es el órgano responsable de la coordinación y sintonización de los movimientos corporales, así como del equilibrio y la regulación del tono muscular. Para ello, recibe e integra distintos tipos de información: la posición y estado de los músculos y articulaciones, la cantidad de tono muscular, el estado de equilibrio del cuerpo y las órdenes que deben enviarse a los músculos desde la corteza motora cerebral. Como consecuencia, una persona con daño cerebeloso, aunque no está paralizada, tiene movimientos lentos, descoordinados, trémulos, y con tendencia a caer (Liebman, 1991).

El cerebelo realiza sus funciones a un nivel inconsciente. Sin embargo, investigaciones recientes indican que los circuitos cerebelosos son clave en la iniciación de los movimientos voluntarios, en el cronometraje de la secuencia de los movimientos simples que componen un movimiento complejo, y en el aprendizaje y la retención de las habilidades y destrezas motoras (Jacobson y cols., 2008).

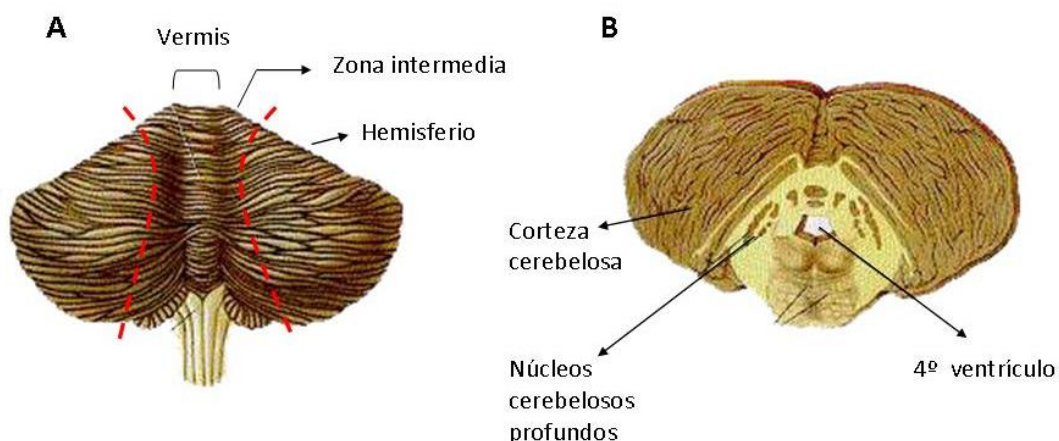


Figura 1.- (A) Vista dorsal del cerebelo mostrando el vermis, zona intermedia y hemisferios. (B) Sección transversal del cerebelo que muestra la corteza cerebelosa y los núcleos cerebelosos profundos.

Desde el punto de vista histológico, en las ataxias las neuronas más afectadas son las células de Purkinje (CP), las neuronas de la capa granulosa o granos, y las neuronas de los núcleos profundos del cerebelo. Los dos primeros tipos de neuronas localizadas en la corteza cerebelosa, son los que reciben la información procedente del exterior y el último tipo, inmerso en la médula del cerebelo, constituye la principal eferencia del cerebelo (Fig. 1). Por ello, la alteración de estas neuronas es determinante en la función cerebelosa.

Los impulsos aferentes al cerebelo llegan directamente a las CP vía las fibras trepadoras de los axones originados en el complejo de la oliva inferior (Huang, 2008), e indirectamente vía las fibras musgosas de los axones originados en distintos núcleos del encéfalo y de la médula espinal, que acaban formando las fibras paralelas (Berretta y cols., 1991a; Berretta y cols., 1991b)(Fig. 2). Ambos tipos de aferencias son glutamatérgicas excitatorias y envían colaterales a los núcleos profundos, inmersos en la médula cerebelosa. Las fibras paralelas a su vez, establecen sinapsis excitatorias con las dendritas de las neuronas inhibitorias de las CP, las células estrelladas y las células en cesto (Ekerot y cols., 1995) y con otras interneuronas, las células de Golgi, que inhiben a su vez a las neuronas de la capa granulosa, estableciendo un circuito de inhibición retroalimentado (Fig.2).

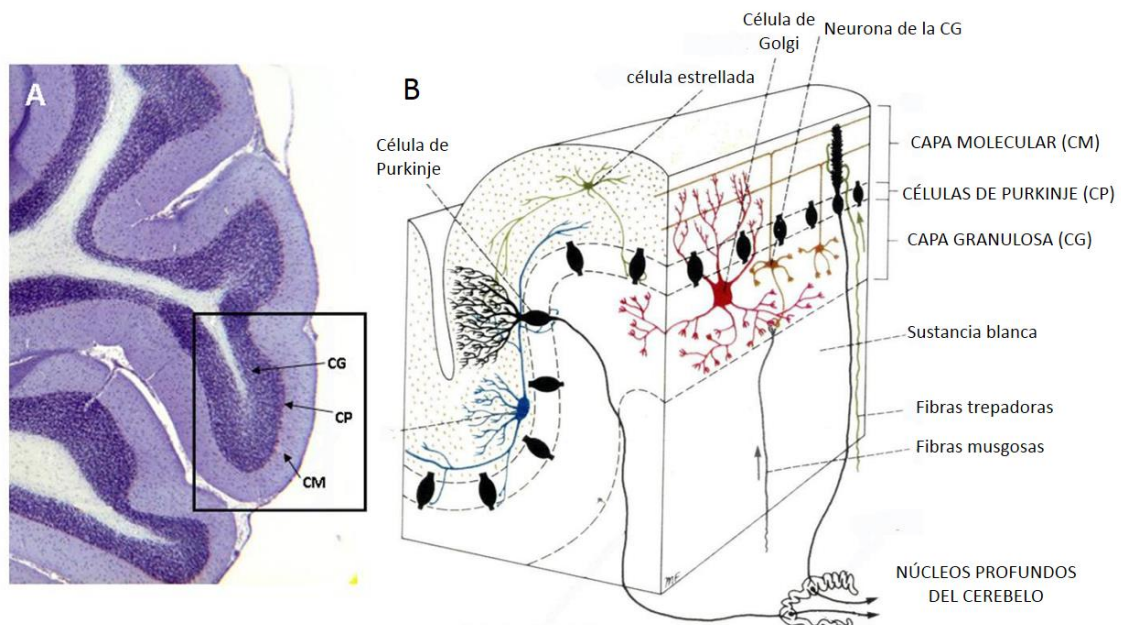


Figura 2.- Esquema de la corteza cerebelosa. Se representan los elementos principales de cada una de las capas que constituyen la corteza así como conexiones nerviosas del cerebelo. Modificado de Kahle, 2003.

Los núcleos profundos también son modulados por las CP (Sillitoe y Joyner, 2007) y por las neuronas de la capa granulosa a través de distintas interneuronas, localizadas en las distintas capas del cerebelo, que son inhibitorias y utilizan el ácido gamma amino butírico (GABA) como neurotransmisor (Nunzi y cols., 2001). El resultado final de este conjunto de excitaciones e inhibiciones consiste en la descarga por parte de los núcleos profundos de un patrón organizado de impulsos. Este actúa sobre las vías motoras, coordinando la acción de los músculos agonistas, antagonistas y sinergistas tanto de las contracciones

musculares tónicas que mantienen el equilibrio y la postura, como de las responsables de los movimientos finos voluntarios.

Por otro lado, también se han descrito en algunas ataxias, alteraciones histológicas en los tractos aferentes al cerebelo (Koeppen y Mazurkiewicz, 2013) que llevan la información de la sensibilidad propioceptiva de los músculos y tendones del cuerpo, además del estado de equilibrio, esenciales para el funcionamiento del cerebelo. El estudio de los siguientes tractos (Fig.3), así como de las neuronas que los originan, puede ser importante para conocer la evolución de la patología de algunas ataxias:

- a) el tracto cuneocerebeloso, cuyas fibras salen del núcleo cuneiforme lateral, donde terminan las fibras propioceptivas correspondientes a las extremidades superiores y parte superior del tronco.
- b) el tracto espinocerebeloso posterior (dorsal), cuyas fibras nacen en la columna de Clarke del asta dorsal de la médula torácica y lumbar superior, donde terminan las fibras propioceptivas correspondientes a las extremidades inferiores y parte inferior del tronco.
- c) el tracto espinocerebeloso anterior (ventral), cuyas fibras, en su mayor parte cruzadas, proceden de la base del asta dorsal de la médula lumbar y sacra, donde terminan las fibras propioceptivas y exteroceptivas de la parte más inferior del cuerpo.
- d) los tractos espinoolivario-olivocerebeloso. Las fibras del primero se originan en el asta dorsal de la médula cervical y conducen los impulsos propioceptivos hacia la oliva contralateral. A través del segundo tracto, la oliva manda todas sus fibras al cerebelo.
- e) los tractos espinovestibular-vestibulocerebeloso. Las fibras del primero se originan en el asta posterior de la médula cervical y conducen los impulsos propioceptivos hacia los núcleos vestibulares. El segundo tracto lleva fibras vestibulares primarias, procedentes del ganglio vestibular, y secundarias, procedentes de los núcleos vestibulares.

Todos estos tractos entran en el cerebelo a través del pedúnculo inferior, excepto el espinocerebeloso anterior, que lo hace a través del pedúnculo cerebeloso superior.

Además de estas vías de información al cerebelo, cuando la corteza motora cerebral descarga en las neuronas motoras, el cerebelo recibe información sobre la naturaleza de la descarga a través de los tractos corticopontocerebelares.

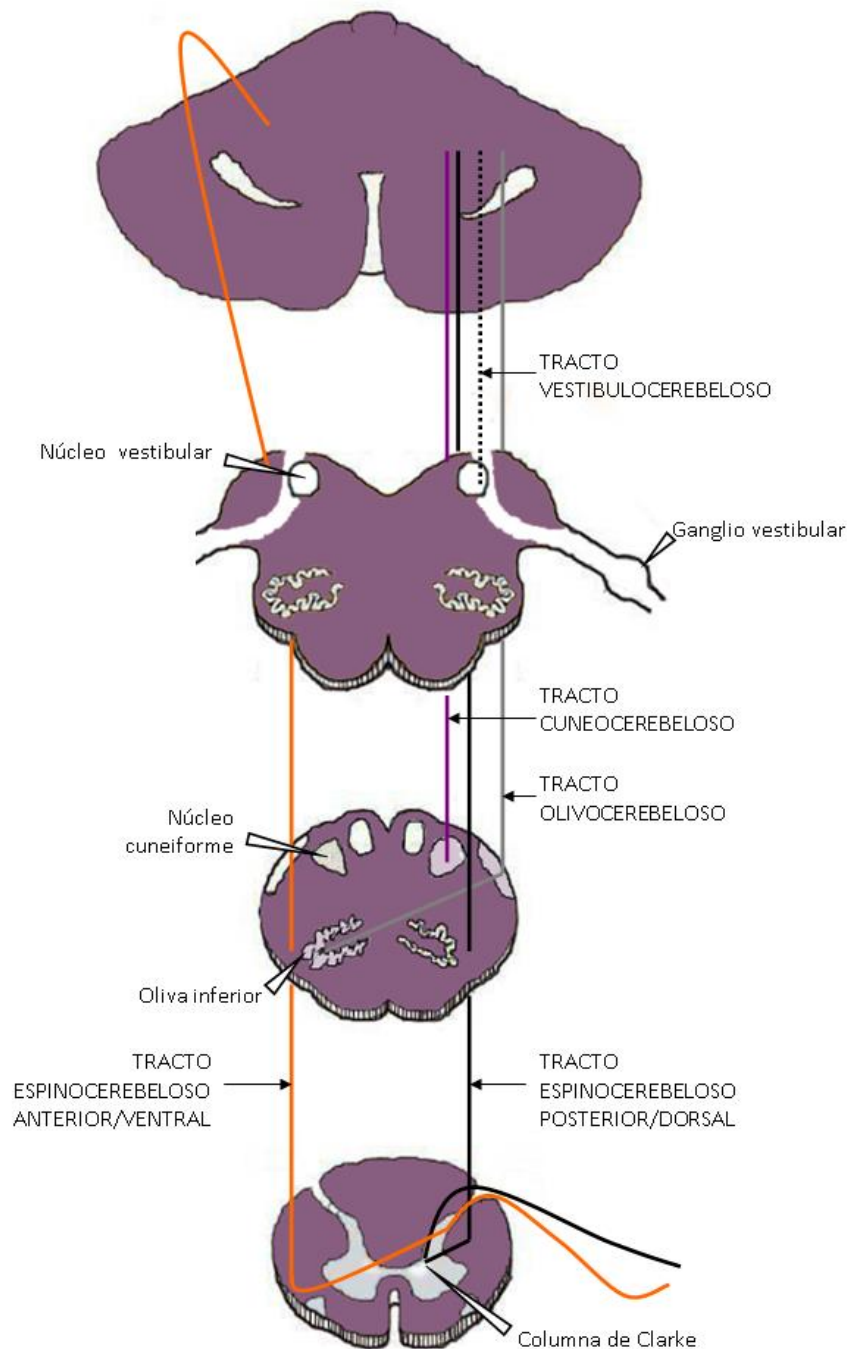


Figura 3.- Esquema de los circuitos aferentes al cerebelo. Se muestra el tracto vestibulocerebeloso (línea discontinua) perteneciente a la vía del cordón posterior. Este tracto porta información propioceptiva y exteroceptiva. La vía del cordón lateral incluye los tractos espinocerebeloso posterior (línea negra) y anterior (línea naranja) que reciben la mayoría de la información propioceptiva de entrada al cerebelo. También parte de la información propioceptiva llega a través del tracto olivocerebeloso (línea gris) y cuneocerebeloso (línea morada). Modificado de Kalhe 2003 (Kahle, 2003).

1.3. Diagnóstico y Clasificación.

El diagnóstico correcto de las ataxias es un desafío ya que hay muchos tipos distintos y los fenotipos resultantes se solapan en ocasiones.

Por su etiología existen tanto formas no hereditarias esporádicas y adquiridas (infecciosas, desmielinizantes, tóxicas, inflamatorias, metabólicas, musculares...) como enfermedades hereditarias presentando todas en común la disfunción del cerebelo (Manto y Marmolino, 2009a, b).

Al hacer el diagnóstico, una vez excluidas las formas adquiridas se plantea el estudio genético para determinar las posibles mutaciones. Esta situación no siempre es posible por el alto coste que significa examinar un gran número de genes, pero la reciente aparición de técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) permite secuenciar incluso el genoma completo a menor coste y tiempo aunque posea limitaciones, ya que presenta dificultades en su capacidad de secuenciar tramos de repeticiones como las poliglutamínicas, así como en descubrir expansiones poliglutamínicas nuevas (Sailer y Houlden, 2012).

Hoy en día, en el 60% de los casos hereditarios, se puede identificar la mutación genética subyacente, mientras que en formas raras de ataxia las mutaciones no están identificadas o no existe la posibilidad de efectuar una prueba genética (Moseley y cols., 1998; Juvonen y cols., 2000; Juvonen y cols., 2005; Kerber y cols., 2005; Durr, 2010).

Encontrar el defecto genético concreto en los pacientes con ataxia cerebelosa es complicado. El relativo fenotipo uniforme de los pacientes dificulta a la hora de investigar el gen diana. Además las ataxias genéticas son consideradas enfermedades raras, es decir que su prevalencia es menor de 50 afectados por cada 100.000 individuos, y todas las ataxias juntas se estima que tienen una prevalencia de 15-20 afectados por cada 100.000 individuos (aunque se sugiere que los datos actuales han infraestimado la extensión del problema) (Klockgether, 2011) por lo que los estudios epidemiológicos así como el interés de la industria farmacéutica es limitado.

Además hay grandes diferencias en la prevalencia de las distintas formas de ataxia en función de las regiones geográficas y según su patrón de herencia (Anheim y cols., 2010). Gracias a los avances en resonancia magnética se ha revolucionado la caracterización morfológica de los desordenes en el cerebro pero la diagnosis final se basa en una combinación de características bioquímicas y estudios genéticos. Un ejemplo de algoritmo de diagnóstico se propone en la Figura 4.

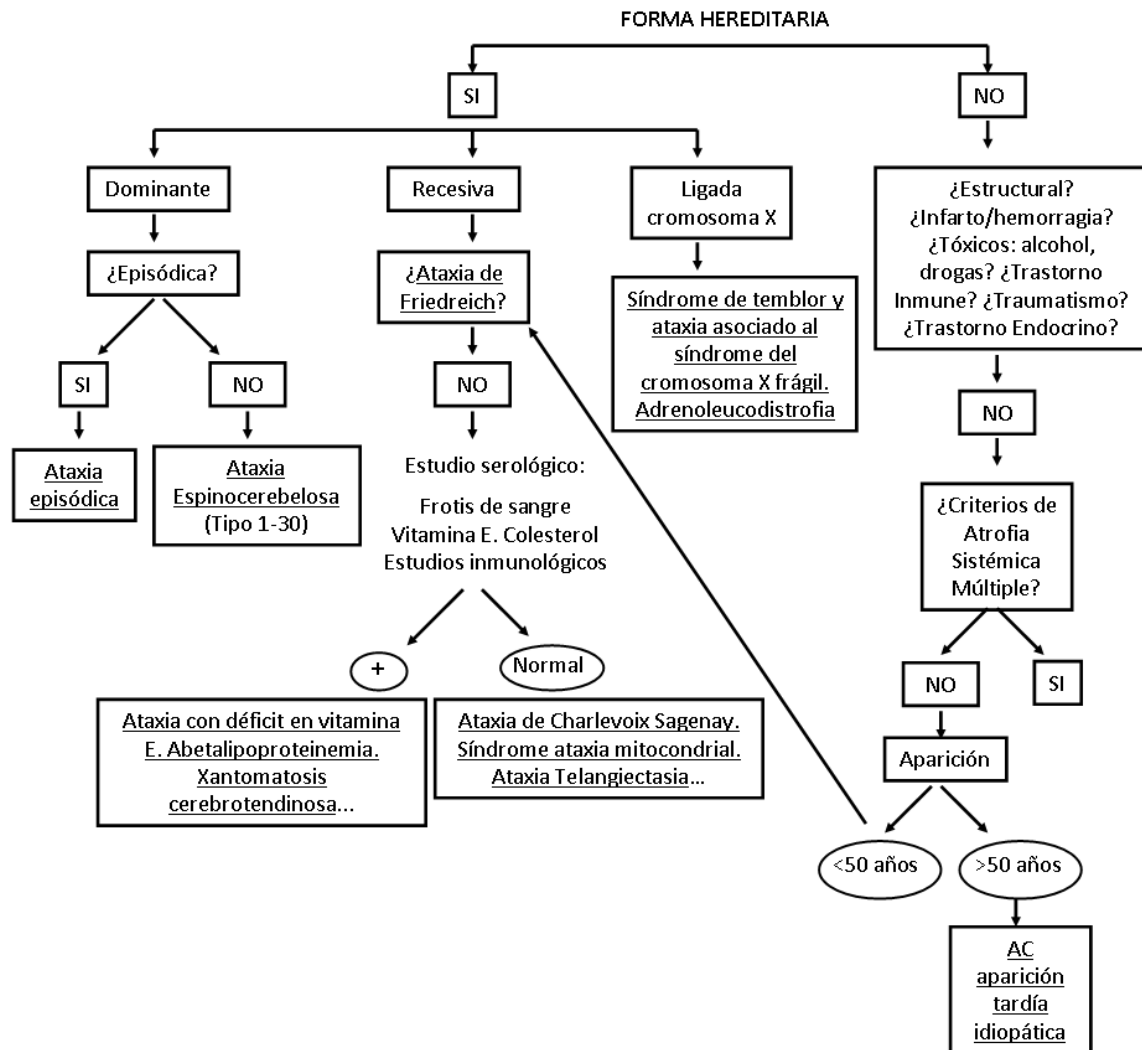


Figura 4.- Algoritmo de diagnóstico de ataxias cerebelosas. La clasificación utilizada se basa en primer lugar en la causa (genética o no) del trastorno. Se continúa con los patrones de herencia para que distintas pruebas genéticas y bioquímicas clasifiquen cada grupo y tipo de ataxia. Modificado de Manto y Marmolino 2009 (Manto y Marmolino, 2009a).

○ Ataxias genéticas/hereditarias.

Las ataxias genéticas son un grupo muy heterogéneo de enfermedades, generalmente son desordenes progresivos con síntomas que muestran un deterioro gradual. Pueden ser ataxias cerebelosas puras o formas complejas con síntomas neurológicos adicionales como neuropatía, signos piramidales y extrapiramidales, oftalmoplejia, deterioro cognitivo y retinopatía (Hersheson y cols., 2012).

Las ataxias hereditarias son producidas por mutaciones en distintos genes así como mutaciones en el mismo gen pudiendo resultar fenotipos muy distintos. Las más frecuentes están causadas por un rango de repeticiones de expansiones polinucleotídicas

(trinucleótidos, pentanucleótidos y hexanucleótidos) aunque también haya casos de mutaciones, duplicaciones y deleciones puntuales (Sailer y Houlden, 2012). Una característica interesante de la etiología genética de muchos tipos de ataxia es la anticipación genética, cuando la causa de la enfermedad es una expansión de una repetición de ADN, cuanto mayor es la longitud de la repetición, disminuye la edad de inicio del trastorno a través de las generaciones.

Clasificación según su modo de herencia (Manto y Marmolino, 2009a, b).

- Ligadas al cromosoma X.

El Síndrome de temblor y ataxia asociado al síndrome del cromosoma X frágil es la representación de este grupo. El trastorno comienza antes de los 50 años y los pacientes muestran una combinación de temblor cinético, ataxia de la marcha, polineuropatía y problemas cognitivos. La mutación (expansión del trinucleotido GGG) que origina el síndrome, afecta a una región del cromosoma X en el que se sitúa la región reguladora del gen FMR-1, produciendo la metilación del gen y, perdiendo su función. El producto de este gen, la proteína fmr1, presenta la capacidad de unirse a determinados ARN mensajeros a pesar de que su función es aún poco conocida.

- Herencia mitocondrial.

Son enfermedades asociadas a irregularidades en el metabolismo energético mitocondrial, mayormente en la fosforilación oxidativa. La función mitocondrial está regulada por un doble sistema genético, el mitocondrial y el nuclear. Las mutaciones de ADN mitocondrial pueden mimetizar las características de los otros patrones de herencia debido a la heteroplasmia y al efecto umbral. La manifestación dominante es la ataxia, por ello se incluyen dentro de la clasificación de ataxias hereditarias pero con un patrón de herencia distinto.

- Autosómicas dominantes.

Incluyen las ataxias espinocerebelosas (SCAs) y ataxias episódicas. Pertenecen a un grupo de trastornos poliglutamínicos, aunque hay casos de mutaciones puntuales o no identificadas. Los trastornos poliglutamínicos se producen cuando una proteína asociada a la enfermedad (Ej: ataxina) contiene una repetición del trinucleotido CAG, que codifica para la glutamina. La edad de aparición surge entre

la tercera y cuarta década de vida aunque puede variar. Se estima que existen unos 42 tipos de ataxias dominantes.

- Autosómicas recesivas.

Grupo heterogéneo causado por mutaciones en distintos genes. Estos genes tienen un tamaño grande y la mutación puede aparecer en distintos lugares. Esto hace su diagnóstico más difícil y costosa. Generalmente también involucran al sistema nervioso periférico. Su aparición comienza antes de los 20 años pero también hay descritas edades de aparición más tardías. Se estima que existen unos 32 tipos de ataxias recesivas.

1.4. Ataxia de Friedreich.

La ataxia de Friedreich es la forma más común de ataxia hereditaria. Su prevalencia se ha estimado en distintas poblaciones de Europa entre 1:20.000 y 1:125.000 siendo la prevalencia del portador entre 1:60 y 1:110 (Parkinson y cols., 2013).

Sigue un patrón de herencia autosómico recesivo y está causada por una mutación en el gen de la frataxina (FXN) causado por una expansión del triplete GAA en el intrón 1 (Campuzano y cols., 1996), lo cual origina una reducción en la expresión de la FXN en los tejidos más afectados por la enfermedad.

Desde que fue descrita por el Dr. Nikolaus Friedreich en 1863, el síndrome atáxico que lleva su nombre ha ido añadiendo nuevos síntomas al fenotipo clínico clásico.

1.4.1. Cuadro clínico.

La edad de aparición se inicia sobre los 20 años o la pubertad. Los síntomas característicos establecidos incluyen manifestaciones neurológicas, cardíacas, endocrinológicas y esqueléticas.

En el fenotipo clásico las características otorgadas a daños neurológicos son: ataxia de la marcha, falta de reflejos en los miembros inferiores, disartria, debilidad piramidal, anomalías en el movimiento ocular, neuropatía auditiva y casos en los que aparece temblor cinético, fatiga y depresión.

Las características no neurológicas incluyen cardiomiopatía hipertrófica (40 % casos), diabetes y malformaciones esqueléticas como escoliosis y pie cavo (Harding y Hewer, 1983; Marmolino, 2011; Farreras-Rozman, 2012; Parkinson y cols., 2013).

1.4.2. Anatomía Patológica.

La neuropatología de la AF engloba degeneración en la médula espinal, cerebelo, ganglios de la raíz dorsal, y núcleos vestibulares (Delatycki y Corben, 2012). El corazón suele estar agrandado y muestra miocardiopatía intersticial con necrosis o degeneración granular de unas fibras, e hipertrofia de otras (Pandolfo y Pastore, 2009; Koeppen, 2011; Farreras-Rozman, 2012).

Las alteraciones histológicas de esta neuropatología se observan inicialmente en los ganglios de la raíz dorsal, mientras que el cerebelo y el tronco del encéfalo muestran una apariencia normal. A medida que avanza la degeneración, aparece atrofia en el vermis anterior y en la médula oblongada (Parkinson y cols., 2013).

Como consecuencia de la degeneración neuronal en los ganglios de la raíz dorsal, estos son proporcionalmente mas pequeños, y las raíces dorsales son mas estrechas debido a la pérdida de los axones de estas neuronas. Estas alteraciones a su vez originan neurodegeneración en la columna de Clarke, y consecuentemente la desmielinización de los tractos espinocerebelosos anterior y posterior. La atrofia de las raíces dorsales también ocasiona pérdida de fibras en las columnas dorsales, provocando una disminución del calibre de la médula, en particular en la región torácica. En fases más avanzadas de la enfermedad se observa degeneración neuronal en el núcleo dentado y de sus fibras eferentes, lo que causa una atrofia del pedúnculo cerebelar superior. También se ha referido una pérdida de algunas neuronas piramidales del área motora cortical, lo que provoca una importante reducción en el número de fibras del tracto corticoespinal (Koeppen, 2011; Koeppen y cols., 2011).

Otras alteraciones que se observan en los pacientes de AF son la desmielinización de las raíces de los nervios glossofaríngeo y neumogástrico y atrofia parcial de los núcleos vestibulares, núcleo rojo, el globo pálido y el tálamo óptico (Farreras-Rozman, 2012).

Estudios en individuos con AF muestran los tres rasgos bioquímicos que caracterizan la patofisiología: 1) depósitos de hierro intracelular (Lamarche y cols., 1980), 2) déficit en el cluster Fe-S mitocondrial presente en enzimas (aconitasa y complejos de la cadena respiratoria I-III) (Rotig y cols., 1997) y 3) la presencia de marcadores de daño oxidativo en sangre y orina (Emond y cols., 2000; Schulz y cols., 2000; Bradley y cols., 2004).

1.4.3 Frataxina.

La frataxina (FXN) es una proteína que se localiza en la mitocondria aunque su función no está todavía bien determinada. Como se demuestra en los ratones *knock-out*, la ausencia completa de FXN conlleva a una letalidad embrionaria (Cossee y cols., 2000).

Aunque su función todavía se debate, hay un consenso en su papel en la biogénesis de los clusters Fe-S en la mitocondria (Tsai y Barondeau, 2010). Los clusters Fe-S son cofactores esenciales para distintas enzimas (Rouault y Tong, 2008). El déficit de FXN origina desajustes en la actividad de estas enzimas, altera el metabolismo de Fe celular con acumulación en la mitocondria, disminuye la producción de energía mitocondrial y aumenta el estrés oxidativo (Babcock y cols., 1997; Rotig y cols., 1997; Bulteau y cols., 2004; González-Cabo y Palau, 2013).

El gen mutado en la AF que codifica para FXN, fue mapeado en el cromosoma 9, concretamente en la región 9q13 (Chamberlain y cols., 1988; Campuzano y cols., 1996; Campuzano y cols., 1997; Koutnikova y cols., 1997).

La mayoría de los pacientes con AF portan la expansión inestable de una repetición de un trinucleotido (GAA) en ambos alelos dentro del primer intrón del gen FXN. Raramente algunos pacientes (4%) tienen la expansión solo en un alelo y una mutación de pérdida de función en el otro (Campuzano y cols., 1996; Cossee y cols., 2000). Los cromosomas normales contienen unas 40 repeticiones GAA mientras que los alelos asociados a la enfermedad contienen de 100-1000 repeticiones (la mayoría entre 600-900). Esta expansión causa el silenciamiento transcripcional de FXN a través de un mecanismo de heterocromatinización originado por cambios epigenéticos. Como consecuencia, las células expresan FXN estructural y funcionalmente normal pero a unos niveles de un 5-30% respecto a los valores normales (Campuzano y cols., 1996; Gottesfeld, 2007; Schmucker y Puccio, 2010; Pandolfo y Hausmann, 2013).

1.5. Tratamientos actuales.

Distintos grupos de estudio de todo el mundo, han desarrollado y validado, diversas escalas de calificación de ataxia para definir con rigor la naturaleza de estas enfermedades, sentando así las bases para conseguir un buen diseño de los estudios clínicos (Schmitz-Hubsch y cols., 2010).

En la actualidad, el tratamiento farmacológico de las enfermedades cerebelosas tiene una eficacia limitada, y por lo tanto el tratamiento etiológico es principalmente sintomático y de apoyo (Fig.5).

Entre las recomendaciones generales están el tratamiento logopédico para la disartria y disfagia manteniendo así la capacidad comunicativa y la prevención de neumonía por aspiración, así como una fisioterapia regular ya que la ataxia mejora con el entrenamiento diario de la postura y la marcha autónoma (Marmolino y Manto, 2010).

SINTOMA	TRATAMIENTO
NISTAGMO	Gabapentina/baclofeno, clonazepam y memantina.
TEMBLOR	Primidona, agentes betabloqueantes adrenérgicos y benzodiazepinas.
ESPASTICIDAD	Baclofeno/tizanidina, benzodiazepinas y fármacos dopaminérgicos
DISTONIA	Difenhidramida o biperideno.
MIOCLONIA	Benzodiazepinas, piracetam o valproato sódico
CALAMBRES	Magnesio, quinina o mexiletina
SINTOMAS PARKINSONIANOS	Levodopa o agonistas dopaminérgicos.

Figura 5.- Tratamientos farmacológicos empleados en la sintomatología de las distintas ataxias (Marmolino y Manto, 2010).

La AF es el trastorno más estudiado, y el conocimiento de la localización de la mutación genética así como la proteína afectada, han permitido el desarrollo de terapias encaminadas a mejorar estos defectos y las consecuencias generadas por ellos.

Como conclusión de los ensayos realizados, ninguna de las drogas utilizadas, incluyendo la Idebenona, tienen efectos beneficiosos en los síntomas neurológicos de los pacientes (Kearney y cols., 2009) aunque los nuevos ensayos con moléculas antioxidantes parecen tener efectos prometedores.

El resumen de los ensayos actuales proporcionados por FARA (Friedreich's Ataxia Research Alliance) en diciembre de 2013 parecen enfocar las terapias en 4 bloques:

1) Encaminadas a disminuir el estrés oxidativo y/o mejorar la función mitocondrial.

- El antioxidante Idebenona es el compuesto más utilizado en el tratamiento de la AF. La molécula de la idebenona es una cadena corta análoga a la coenzima Q (CoQ) que reduce la peroxidación de lípidos y lleva electrones desde los complejos

I y II al III (Meier y Buyse, 2009). La idebenona se ha utilizado en distintos ensayos clínicos y aunque pueda otorgar ciertos beneficios a la función cardiaca, no presenta los efectos neurológicos deseados en los pacientes, aunque se sigue investigando su utilización tanto en combinación con otros compuestos, como su comercialización básica en forma de complemento alimenticio (Rustin y cols., 1999; Mariotti y cols., 2003; Pineda y cols., 2008; Kearney y cols., 2009; Lynch y cols., 2010).

- α -tocofenol quinona (EPI-A001 y EPI 743): Mejoran la función mitocondrial.
- ácido indol-3-propionico (OX1): Previene el estrés oxidativo combinando la captación de radicales y la quelación de metales.
- Deferiprona: Puede redistribuir y eliminar la sobrecarga de Fe ya que es un quelante, pero los ensayos no han mostrado los beneficios deseados con efectos muy modestos (Boddaert y cols., 2007; Sohn y cols., 2008).

En estado preclínico se están probando los inactivadores de radicales en mitocondrias (MRQs) y la estabilización de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).

2) Encaminadas al control de la modulación de las vías metabólicas de la FXN.

- Pioglitazona: Medicamento utilizado en diabetes que induce la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo mitocondrial (Babady y cols., 2007).

En estado preclínico se opta por el enfoque nutricional ya que ciertos compuestos pueden activar a PGC1 α (proteína que recluta y controla la expresión de genes involucrados en el metabolismo energético), que se encuentra disminuida en la AF.

3) Encaminados a la estabilización, potenciación y reemplazo de la FXN.

- Eritropoyetina (EPO): Parece aumentar los niveles de FXN en modelos celulares sin incrementar la transcripción génica (Boesch y cols., 2008; Sacca y cols., 2011).

En estado preclínico se buscan compuestos miméticos de EPO para paliar los efectos secundarios en la hematopoyesis y crecimiento tumoral.

También se encuentra en experimentación el desarrollo de proteínas fusionadas TAT (Transactivadoras de la Transcripción) que contienen una secuencia diana mitocondrial que se puede traslocar a través de las membranas mitocondriales (Del Gaizo y Payne, 2003). En el caso de la AF se está desarrollando la fusión proteica TAT- FXN humana.

4) Encaminadas a aumentar la expresión de genes implicados en la AF.

- Inhibidores de histona deacetilada (HDACi): Para revertir el silenciamiento de la heterocromatina en una conformación activa (Soragni y cols., 2012).
- Nicotinamida (vitamina B3): Ofrece un aumento potencial de la expresión génica de FXN.
- Interferon γ (Tomassini y cols., 2012).

Entre las estrategias emergentes hay enfoques innovadores que están siendo investigados en el área preclínica y en algunos casos a nivel clínico para la AF.

Entre ellas, encontramos como ejemplos el uso de ARN de interferencia (ARNi) con el objetivo de inhibir la expresión de proteínas poliglutamínicas mutadas, la prevención del mal plegamiento de proteínas y la agregación por sobreexpresión de chaperonas.

La terapia génica también se considera experimentalmente. La entrega de proteínas o compuestos por vectores virales en el cerebelo representa un enfoque terapéutico génico, pudiéndose utilizar para la administración génica dirigida al cerebelo *in vivo* (Louboutin y cols., 2010).

También cabe destacar el uso potencial de los factores neurotróficos. Estos compuestos aumentan la supervivencia y diferenciación de determinados tipos neuronales, y son considerados agentes terapéuticos muy prometedores en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas (Fernandez-Espejo, 2004). Se ha notificado una disminución en el suero de pacientes y pérdida a la sensibilidad del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) en distintos tipos de ataxia, lo que sugiere que la neuroprotección observada *in vivo* podría ser utilizada para detener la neurodegeneración cerebelosa (Fernandez y cols., 2005b; Leininger y Feldman, 2005).

Por último, se discute sobre la terapia de reemplazo neuronal. Esta se basa en la mejora de las funciones neurológicas perdidas mediante la introducción o implante de nuevas células. Esta terapia, potencialmente eficaz, se encuentra todavía en las primeras etapas experimentales. La reprogramación de células somáticas humanas a partir de tejidos accesibles como piel y sangre (Saha y Jaenisch, 2009; Erceg y cols., 2010; Tenzen y cols.,

2010), representan un punto de partida idóneo para el desarrollo de terapias eficientes en la ataxia cerebelosa, por su capacidad para regenerar tejido nervioso, pero requiere su adecuación a la enfermedad.

1.6. Modelo experimental de ataxia cerebelosa inducido por la neurotoxina 3-acetilpiridina.

La neurotoxina 3-acetilpiridina (3-AP) es un antagonista competitivo de la nicotinamida que induce una lesión selectiva de las neuronas de la oliva inferior en la rata. Como consecuencia de la destrucción de este núcleo del tronco del encéfalo, se produce un descenso significativo en diversos marcadores de la función olivo-cerebelosa, y los animales desarrollan ataxia y pierden el equilibrio (Desclin y Escubi, 1974; Balaban, 1985; Torres-Aleman y cols., 1991; Fernandez y cols., 1998). El mecanismo de acción de esta neurotoxicidad tan selectiva todavía es objeto de estudio.

La oliva inferior, localizada en la región ventral de la medula caudal, está compuesta por tres subnúcleos: oliva accesoria medial (OAM), oliva accesoria dorsal (OAD) y oliva principal (OP). Las neuronas de cada subnúcleo, reciben información de regiones específicas del sistema nervioso central y sus axones proyectan a regiones específicas de la corteza cerebelosa (Fig.6). Es decir, que a lo largo de los distintos subnúcleos de la oliva inferior se crea una distribución topográficamente organizada de las aferencias y correspondientes eferencias.

Además de la gran afluencia de señales y su compartimentalización, la oliva tiene una gran importancia en el funcionamiento del cerebelo, ya que sus axones terminan como fibras trepadoras que envían señales glutamatérgicas excitatorias a la corteza del cerebelo, concretamente a las CP.

Como consecuencia, el sistema olivocerebeloso constituye un lugar de integración de señales sensoriales y motoras del sistema nervioso. Además, parece implicado, no sólo en el control de los movimientos simples, sino también en la coordinación y precisión de comportamientos motores más complejos (Ausim Azizi, 2007; Jacobson y cols., 2008).

La falta de funcionalidad de la oliva inferior por degeneración neuronal masiva origina una alteración en el comportamiento motor similar a una cerebeloctomía. La reducción de estas neuronas da lugar a una disminución en número y alteración morfológica de las fibras trepadoras que llegan al cerebelo, así como un descenso significativo en los

indicadores de la función cerebelosa (calbindina, glutamato, GLUR1 y GABA) (Fernandez AM 1998). Como consecuencia se provoca una ataxia permanente en la rata.

La ablación química de la oliva inferior ocasionada por la neurotoxina 3-AP, es un modelo animal de ataxia cerebelosa aceptado por la comunidad científica, para el estudio de la degeneración olivo-cerebelosa humana (Butterworth, 1992).



AFERENCIAS CEREBELO	SUBNUCLEO OLIVA	EFERENCIAS CEREBELO
Médula espinal	OAD	Vermis anterior y regiones de cerebelo intermedio
Núcleo cuneiforme	OAM	
Núcleo vestibular	OAM	Vermis posterior y flocculo
Tectum		
Pretectum		
Tracto nervio óptico	OAM Y OP	Hemisferios y flocculo
Núcleo rojo	OP	Hemisferios
Córtex		
Tálamo		

Figura 6.- Representación de 3 niveles coronales de la oliva inferior obtenidos en sentido postero-anterior. Cada color define un subnúcleo de la oliva, asociada a sus correspondientes aferencias y eferencias. Cada una de estas regiones de la oliva tiene funciones específicas. Modificado de Ausim Azizi 2007 (Ausim Azizi, 2007).

1.7. Modelos experimentales genéticos de ataxia.

A continuación se describen diversos modelos animales que presentan degeneración de neuronas implicadas en el control motor.

○ Raton mutante PCD (*Purkinje Cell Degeneration*)

La mutación *pcd* apareció espontáneamente en la estirpe C57br/cdJ en los laboratorios Jackson. Posteriormente se transfirió a la estirpe C57BL/6J localizándose en el cromosoma 13 del ratón y se define como autosómica recesiva. Sufre una degeneración selectiva y progresiva postnatal de las CP, y la capa granular también

parece afectada. Los mutantes de avanzada edad muestran además degeneración en la retina y bulbo olfatorio (Mullen y cols., 1976).

- Ratón mutante *lurcher*.

Descrito en 1960 por R.J.S. Philips, se origina a partir de una mutación espontánea autosómica dominante caracterizada por una ataxia tambaleante, debida a la degeneración selectiva postnatal de las CP así como de la mayoría de sus aferencias, tanto de las neuronas de la capa granulosa como de las neuronas de la oliva. La causa de esta degeneración se debe a la mutación del receptor de glutamato $\delta 2$. Los animales homocigotos mueren al nacer mientras los heterocigotos son viables mostrando anormalidades en las CP a los 4 días de nacimiento (Vogel y cols., 2007).

- Ratón mutante *weaver*.

Este modelo presenta hipoplasia cerebelosa. Muestran un modo de andar desigual, serpenteante, ataxia, hiperactividad locomotora leve y, ocasionalmente, convulsiones tónico-clónicas. Las áreas del cerebro más afectadas son: La corteza cerebelosa, donde las neuronas de la capa granulosa mueren poco después del nacimiento y la sustancia negra en la que las neuronas dopaminérgicas se encuentran gravemente diezmadas (Harkins y Fox, 2002).

Desde hace 15 años, cuando se descubrió la relación entre AF y FXN se han generado modelos animales que han ayudado a entender la función de la FXN, la patofisiología de la enfermedad y algunos de los mecanismos implicados en el silenciamiento e inestabilidad de la repetición del trinucleótido GAA.

Debido a la alta conservación evolutiva de la FXN, se ha estudiado en distintos organismos la generación de distintos modelos experimentales, siendo el ratón y las células de mamífero los mejores candidatos por su respuesta a la patofisiología de la enfermedad y la complejidad del fenotipo clínico (Martelli y cols., 2012).

En primer lugar, se intentó crear un ratón *knock out* para la FXN pero no era viable (Cossee y cols., 2000).

Los primeros modelos viables se utilizaron siguiendo los avances del sistema de recombinación Cre-Lox eliminando el exón 4 de la FXN de un alelo condicional.

Se obtuvieron modelos cardíacos (MCK-Cre) (Puccio y cols., 2001), y neuronales (PrP-CreERT) (Simon y cols., 2004), que reproducían algunas de las características principales

de la enfermedad como hipertrofia cardiomiopática y ataxia progresiva espinocerebelar y sensorial.

A pesar de que los modelos condicionales son buenas herramientas para reproducir la enfermedad en corazón, sistema nervioso y para probar distintos avances terapéuticos, no mimetizan la enfermedad humana. En los pacientes con AF, la presencia de la expansión GAA en al menos uno de los alelos del gen de la frataxina, produce una baja síntesis de la FXN con estructura normal (Campuzano y cols., 1996). Por lo que, la progresión de la enfermedad resulta de la presencia de una pequeña cantidad de FXN a lo largo de la vida, más que un completo déficit de ella durante un intervalo de tiempo, que es lo que sucede en el mutante condicionado.

Por ello, se empezaron a desarrollar los modelos murinos basados en la repetición del trinucleotido GAA para revelar los mecanismos moleculares y celulares asociados con el silenciamiento del gen de la FXN, así como para poder evaluar la acción terapéutica de drogas candidatas a paliar este proceso.

Estos modelos se obtienen usando un enfoque *knock in* basado en la recombinación homóloga o un enfoque transgénico con genoma humano y cromosoma artificial de levadura (YAC).

- KIKO: *knock in knock out* heterocigoto. Expresa un nivel de un 25-35% de la FXN comparado con el *wild type*. No hay más fenotipo observable en el KIKO, sugiriendo que la disminución transcripcional no alcanza el umbral crítico de FXN necesario para inducir la patología (Miranda y cols., 2002).
- KIKI: Doble *knock in* homocigoto con 230 repeticiones GAA. Tiene una disminución de un 25% en la expresión de FXN. No hay más fenotipo observable aunque si presenta marcadores de heterocromatina en el tramo GAA (Miranda y cols., 2002).

El análisis del transcriptoma de KIKI y KIKO revela modificaciones transcripcionales significativas comparados con los controles, estas implican una desregulación transcripcional en la ruta PPAR γ (expresión de PGC1 α) en muestras de hígado y músculo (Coppola y cols., 2009). A día de hoy aún no se conoce en toda su extensión la relación entre la deficiencia de FXN y el control metabólico.

- Fxn^{tm1Mkn}/ Tg(FXN)YG8Pook (YG8R): Ratón transgénico en el que el cromosoma artificial de levadura (YAC) contiene el locus humano completo de la FXN con la expansión GAA y se ha eliminado la FXN endógena de ratón. Muestra una ataxia progresiva con afectación de los ganglios de la raíz dorsal (neurodegeneración y aparición de grandes vacuolas). Presenta disminución en la expresión de FXN humana con marcadores de heterocromatina en el tramo GAA, un empeoramiento en la coordinación motora así como disminución de la actividad aconitasa en el cerebelo. Además, se ha constatado la acumulación de hierro mitocondrial y signos de peroxidación lipídica que sugieren la formación de especies reactivas de oxígeno, aunque este modelo no muestra una disfunción cardíaca severa (Al-Mahdawi y cols., 2006).

Generar un modelo adecuado es complejo, las mayores dificultades están en la longitud de la expansión GAA necesaria para inducir la enfermedad, así como el locus de integración genómica y la inestabilidad intrínseca del trinucleótido GAA, que puede resultar en una contracción o elongación de la expansión.

Tanto KIKI como YG8R son herramientas útiles para estudiar los mecanismos implicados en el silenciamiento GAA y la inestabilidad somática GAA.

Actualmente, para obtener nuevos modelos con un fenotipo más severo se está intentando aumentar el tamaño de la expansión GAA dentro del transgén humano de FXN (Martelli y cols., 2012).

2. TRATAMIENTO CON FACTORES TRÓFICOS EN ATAXIA.

Los factores tróficos son unas moléculas, generalmente de tipo proteico, que se han descrito en función del tejido o área donde se producen y ejercen su acción a nivel local. Intervienen en todo tipo de funciones celulares, su papel ha sido muy estudiado en las fases iniciales del desarrollo donde participan en todos los procesos involucrados en la formación de un individuo adulto (proliferación celular, migración). En el organismo adulto cumplen igualmente funciones en la división celular, diferenciación y homeostasis. El término para definir esta multiplicidad de acciones biológicas es pleiotropismo.

En el sistema nervioso desempeñan un papel importante durante el desarrollo embrionario afectando al crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de las neuronas (Feldman y cols., 1997). La expresión continuada de estos factores y sus receptores tras el desarrollo proporcionó pruebas afirmativas de su participación en el mantenimiento, conectividad y función de la estructura cerebral madura (Jelsma y Aguayo, 1994). Se ha propuesto un posible papel terapéutico tras el daño en el cerebro, medula o nervios periféricos (Connor y Dragunow, 1998). Estos factores pueden actuar como : 1) Agentes neuroprotectores sobre determinadas poblaciones neuronales que están afectadas de manera selectiva en las enfermedades neurodegenerativas y 2) Moléculas protectoras frente al daño celular citotóxico.

Debido a estas propiedades, estos factores pueden ser beneficiosos en el tratamiento de las ataxias cerebelosas, y de hecho ya se han realizado estudios con algunos de ellos tal y como se detalla a continuación.

2.1. Factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales (GDNF).

Miembro de la familia del TGF- β (Factor de crecimiento transformante β), es un factor trófico para distintas poblaciones neuronales implicadas en el control motor.

Promueve la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra y de sus proyecciones hacia el estriado en estudios de neurotoxicidad con 6-hidroxidopamina (Rosenblad y cols., 1999). Esta descrito que ejerce una acción neuroprotectora sobre las neuronas motoras en un modelo transgénico de esclerosis lateral amiotrófica (Manabe y cols., 2003) y en las neuronas cerebelosas en un modelo de toxicidad con etanol (McAlhany y cols., 1997) sugiriendo que el GDNF afecta a distintos tipos de neuronas del sistema motor.

Las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral en el ratón atáxico mutante *weaver*, aumentan su supervivencia tras una simple inyección de GDNF (Broome y cols., 1999). La infusión crónica intraventricular del factor también aumenta la supervivencia de las CP en un modelo de ataxia en rata (Tolbert y Clark, 2003). En este último estudio, el efecto neuroprotector solo se observó durante el tiempo de infusión, sin que presentara un efecto permanente.

Las CP no expresan GDNF ni sus receptores aunque estructuras adyacentes a ellas si poseen el complejo receptor (Trupp y cols., 1997). Así que el efecto neuroprotector de GDNF sobre las CP debe estar mediado por otras neuronas intracerebelosas.

En un modelo de ratón mutante atáxico, el tratamiento conjunto con IGF-1 y GDNF también es capaz de promover la supervivencia de las CP. Esta acción protectora podría estar mediada por las fibras trepadoras ya que la ablación química de la oliva inferior previa al tratamiento impide este efecto neuroprotector sobre las CP (Hess y cols., 2003).

2.2. Factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I).

Es el miembro neurotrófico más conocido de la familia de factores de crecimiento insulínicos. Mientras su importancia fisiológica en el tejido nervioso todavía es objeto de estudio, la manipulación genética con animales de laboratorio ha mostrado que tiene un papel importante durante el desarrollo cerebral (Pulford y cols., 1999; Aberg y cols., 2000). Durante el desarrollo, tanto las células de la glía como las neuronas expresan IGF-I y su receptor, siendo el cerebelo una de las áreas que presentan mayor contenido de IGF-I durante el desarrollo, en particular las CP (Ye y cols., 1996).

Poco después del nacimiento, la síntesis de IGF-I comienza a decrecer en todas las áreas cerebrales y las células de la glía dejan de sintetizarlo (Fernandez y Torres-Aleman, 2012).

Dado que el IGF-I circulante cruza la barrera hematoencefálica (Zoghbi, 2000), se ha analizado la contribución IGF-I del suero a la fisiología del cerebro, concluyendo que es una hormona fisiológicamente neuroprotectora que modula la neurogénesis (Carro y cols., 2000), la excitabilidad neuronal y varios procesos de neuroprotección (Peretz y cols., 2001). Así el IGF-I no está considerado un agente específico protector del cerebelo sino que afecta a muchos tipos neuronales del cerebro.

Se han encontrado disminuciones en el IGF-I circulante y cerebelar en modelos animales de ataxia cerebelosa (Chen y cols., 2003; Zhang y Yee, 2004) así como en el suero de pacientes atáxicos (Torres-Aleman y cols., 1996; Backeljauw y Underwood, 2001; Giovannucci, 2003). Esto es curioso ya que la mayor parte de IGF-I circulante se sintetiza en el hígado, un órgano que parece no tener asociación con la ataxia (Lai y cols., 1997).

Una posible explicación es que las neuronas del cerebelo requieran IGF-I (Aberg y cols., 2000), de forma que cuando estas neuronas se dañan, se activa un sistema neuroprotector que facilita la acumulación de IGF-I así como un aumento en la expresión

de sus receptores en las zonas dañadas (Giovannucci, 2003) llevando al agotamiento a las células productoras de IGF-I. Como explicación alternativa se ha propuesto que las neuronas dañadas, a través de señales desconocidas influyen de forma indirecta sobre la producción de IGF-I, por ejemplo, del hígado. De hecho, las citoquinas proinflamatorias inhiben la producción de IGF-I en el hígado lo que podría provocar un daño neuronal exacerbado (Rustin, 2003). Ello ha permitido sugerir que la disminución de IGF-I en el cerebro de los pacientes atáxicos es un efecto secundario de la cascada de muerte neuronal desencadenada por mecanismos patogénicos específicos de la enfermedad.

El tratamiento con IGF-I ha sido efectivo en modelos de ataxia cerebelosa (Fernandez y cols., 1998; Perlman, 2000; Peretz y cols., 2001) y esto, junto con la observación de los niveles alterados de IGF-I en distintos tipos de ataxia, implica que este factor puede ser un buen candidato para su aplicación terapéutica en este grupo de enfermedades, aunque un aspecto importante que necesita mayor estudio es la dosis y la vía de administración. El mayor obstáculo en el desarrollo de la terapia es eliminar la relación entre IGF-I y el riesgo de cáncer (Beck y cols., 1995). Aunque algunos estudios han mostrado que la administración prolongada de IGF-I es segura (Werther y cols., 1990), el que sea un potente factor de crecimiento anti-apoptótico indica que podría aumentar el riesgo de generar tumores (Torres-Aleman, 2000). El prometedor papel del IGF-I en el tratamiento de las ataxias cerebelosas se basa en los efectos beneficiosos que tiene en los tejidos que suelen estar asociados a las ataxias. En conclusión, a pesar de las pruebas preclínicas y los ensayos que indican que a dosis de 50-100 µg/kg/día no muestran efectos deletéreos es necesario el diseño de buenos ensayos clínicos para los distintos tipos de ataxia.

3. FACTOR DE CRECIMIENTO DEL HÍGADO (LGF).

El hígado es uno de los órganos con mayor capacidad de regeneración. Entre los diversos mecanismos que se han propuesto a la hora de explicar esta gran capacidad de regeneración del hígado, destaca la presencia de uno o varios tipos de factores tróficos en el suero de animales con hepatectomía parcial, siendo los responsables de las tasas de proliferación celular hepática observadas.

El factor de crecimiento de hígado (LGF) es un mitógeno hepático purificado hace algunos años por el grupo de investigación del Dr. Díaz-Gil del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid (Díaz-Gil y cols., 1986a; Díaz-Gil y cols., 1986b; Díaz-Gil y cols., 1987). En 1986, estos autores observaron un componente endógeno con actividad mitogénica sobre los hepatocitos, que más tarde fue caracterizado como una biliproteína. Consiguieron purificar del plasma procedente de ratas parcialmente hepatomizadas una molécula de 64 KDa, que inyectada en ratones fue capaz de estimular la síntesis de ADN en el hígado y de incrementar el índice mitótico de los hepatocitos. Además, la administración de esta molécula purificada, en cultivos primarios de células hepáticas de rata, promovió la síntesis de ADN, la actividad del sistema A de transporte de aminoácidos e incrementó la captación de $^{22}\text{Na}^+$.

La concentración de LGF es prácticamente indetectable en el suero de rata y humano de individuos sanos, pero incrementa significativamente en procesos de daño hepático (Díaz-Gil y cols., 1988; Díaz-Gil y cols., 1989). El LGF purificado a partir de suero de humanos con hepatitis tipo B muestra características casi idénticas al obtenido a partir de suero de ratas (Díaz-Gil y cols., 1989).

3.1. Naturaleza química del LGF.

La estructura química del LGF fue caracterizada y definida como un complejo albúmina bilirrubina (biliproteína). Para ello realizaron distintos estudios de espectros de absorción, fluorescencia, dicroísmo celular, mapas trópticos, composición de aminoácidos, movilidad electroforética, formación de complejos albúmina-bilirrubina *in vitro*, estudio de la actividad biológica tanto *in vivo*, como *in vitro* e identificación por HPLC (Díaz-Gil y cols., 1987).

Para demostrar que el LGF era un complejo seroalbúmina-bilirrubina, sintetizaron *in vitro* complejos albúmina-bilirrubina y demostraron que cuando se incubaba bilirrubina con albúmina se formaba un complejo que ejercía la actividad biológica característica del LGF. En cambio, la albúmina o la bilirrubina por sí mismas no presentaban actividad mitótica en el hígado de ratones al ser administradas de manera independiente (Díaz-Gil y cols., 1987). La aparición de actividad biológica del complejo albúmina-bilirrubina parece ligada a un cambio conformacional en la albúmina provocada por el enlace covalente de la bilirrubina (Díaz-Gil y cols., 1988).

3.2. Efectos biológicos del LGF.

El efecto más característico de este factor es el de actuar como un mitógeno hepático. Cuando el LGF es inyectado a ratas o ratones sanos tiene actividad *in vivo* como factor de crecimiento, incrementando la síntesis de ADN en los hepatocitos del hígado, el peso seco del hígado y el número de células positivas para el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Como consecuencia, se origina una hiperplasia transitoria sin que se detecten efectos agresivos, ni inmediatos ni permanentes, es decir, sin producción de fibrosis, amiloides, ni lesiones mitocondriales o nucleares (Díaz Gil y cols., 1994).

La acción del LGF a largo plazo no parece alterar la homeostasis, puesto que un año después de la inyección de LGF, el hígado, el páncreas, los riñones y el bazo no muestran signos de degeneración o de fibrosis (Díaz Gil y cols., 1994).

El LGF es capaz de estimular la regeneración del hígado dañado por diversas hepatotoxinas (Díaz-Gil y cols., 1999). En un modelo de cirrosis por tetracloruro de carbono, la inyección del LGF una vez establecido el daño, fue capaz de disminuir la fibrosis, produciendo una reestructuración sustancial del parénquima hepático consistente en la mejora de la inflamación y de la necrosis, el aumento de la funcionalidad hepática y la recuperación de diversas funciones hemodinámicas (presión portal, presión arterial, y resistencia vascular sistémica), así como la reducción de la ascitis. En otro modelo de cirrosis-fibrosis por ligadura del conducto biliar en ratas, la inyección del LGF en diferentes estadios del daño hepático originó una disminución sustancial de la fibrosis y cirrosis y una mejora funcional del hígado en diversos tests (Díaz-Gil y cols., 2008, 2009). Asimismo, se mostró que la actividad antifibrótica del LGF puede ser debida a la modulación del estado de la actividad de las células estrelladas hepáticas y

de los miofibroblastos (Díaz-Gil y cols., 2009) y a la inhibición de la síntesis de determinados mediadores fibrogénicos tales como el factor transformante de crecimiento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y las metaloproteasas de la matriz 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9) (Díaz-Gil y cols., 2008).

También se ha descrito que la acción mitogénica ejercida en el hígado por el LGF puede estar mediada, al menos en parte, por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Díaz-Gil y cols., 2003), ya que el LGF produce la regulación a alza de esta citoquina, actuando sobre las células endoteliales de la vena porta. Además, el LGF también estimula la secreción de TNF- α en cultivos de células endoteliales humanas (HUVEC). Esta secreción es del orden de pg/ml, al contrario de lo que se produce en los procesos inflamatorios donde las secreciones de TNF- α son mayores. De hecho, los efectos del LGF en HUVEC mediados por TNF- α no incrementan la expresión de las moléculas de adhesión endotelial ICAM-1 (Molécula de adhesión intercelular 1) y VCAM-1 (Molécula de adhesión de células vasculares 1), las cuales juegan un papel clave en los efectos proinflamatorios mediados por esta citoquina (Díaz-Gil y cols., 2003).

Trabajos más recientes indican que el LGF aumenta la proliferación de distintos tipos celulares, y promueve la regeneración de otros tejidos dañados incluido el cerebro.

- El LGF tiene un papel promotor en la regeneración testicular. La administración de LGF en ratas con deplección de las células de Leydig, estimula la regeneración testicular, promueve el crecimiento de las células germinales y estimula la síntesis del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de sus receptores (Martín-Hidalgo y cols., 2007a; Martín-Hidalgo y cols., 2007b). Además, en ratones tratados con bisulfan, un agente que destruye selectivamente las células madre espermatogoniales, el LGF también es capaz de mejorar la regeneración testicular y recuperar la espermatogénesis (Perez-Crespo y cols., 2011).
- En un modelo de fibrosis pulmonar inducida por cloruro de cadmio, la administración de LGF mejora la función pulmonar y es capaz de revertir parcialmente tanto la fibrosis pulmonar como el incremento de las proteínas de la matriz pulmonar (Martínez-Galan y cols., 2010).

○ El LGF también tiene la capacidad para reducir la hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas, mejorando considerablemente la estructura y función vascular, y reduciendo la presión arterial (Somoza y cols., 2006). Además, también restaura la composición de la pared de los vasos imiocárdicos y reduce la hipertrofia del ventrículo izquierdo (Conde y cols., 2011). Ya que el estrés oxidativo es una de las características en la patofisiología de la hipertensión y está implicado en la fibrosis vascular y disfunción endotelial, los autores sugieren que el LGF puede ejercer en parte sus acciones regenerantes a través de un mecanismo antioxidante (Condezo-Hoyos y cols., 2012).

La bilirrubina tiene propiedades antioxidantes por si sola o unida a la albúmina, esta última forma es la más común de transporte en el suero (Stocker, 2004; MacLean y cols., 2007). De hecho, hay pruebas epidemiológicas que demuestran la asociación entre concentración baja de bilirrubina en suero y el aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular (Mayer, 2000; Perlstein y cols., 2008).

El LGF también posee una notable actividad antioxidante *in vitro* ya que se ha demostrado su efectividad como secuestrador de varias especies reactivas de oxígeno implicadas en la patología cardiovascular (Condezo-Hoyos y cols. 2009). Además, *in vivo* normaliza los niveles de los biomarcadores de estrés oxidativo en plasma (Condezo-Hoyos y cols., 2012). Estos efectos se unen a las acciones regenerativas cardiovasculares del LGF, y deberían contribuir a una disminución del riesgo cardíaco.

○ En el Sistema Nervioso Central (SNC) la aplicación de LGF intracerebral en el estriado de ratas hemiparkinsonianas estimula el crecimiento de los terminales dopaminérgicos dañado en el estriado denervado e induce una mejoría conductual significativa en dichos animales (Reimers y cols., 2006). Además, cuando se inyecta intraventricularmente, es capaz de activar las señales que promueven la generación de nuevas neuronas (neurogénesis) a partir de progenitores neurales de la zona subventricular, y la migración de las mismas en el estriado dañado (Bazán y cols., 2005; Gonzalo-Gobernado y cols., 2009).

Es interesante destacar que el LGF también es capaz de estimular el crecimiento de los terminales dopaminérgicos dañados, de proteger parcialmente a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de la neurotoxicidad inducida por la 6-OHDA, y de mejorar la conducta rotacional estimulada por apomorfina de los animales

hemiparkinsonianos cuando es administrado intraperitonealmente (Gonzalo-Gobernado y cols., 2013) lo que facilita en gran medida su posible utilización clínica en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

En cuanto a las dianas celulares que median las acciones del LGF en el SNC, resultados descritos en nuestro laboratorio indican que estos efectos pueden estar mediados por la activación de la microglía (Gonzalo-Gobernado y cols., 2013). Aunque la microglía activada se ha asociado con la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas (Rao y cols., 2012; More y cols., 2013; Rizzo y cols., 2014), estas células pueden jugar un papel clave en el desarrollo y la regeneración del sistema nervioso central mediante la liberación de factores tróficos y de moléculas de la matriz extracelular (Polazzi y Contestabile, 2002; Streit, 2002; Wine y cols., 2009; Hung y cols., 2010; Liang y cols., 2010; Narantuya y cols., 2010). Además, la microglía activada es capaz de producir y liberar TNF- α (Suzuki y cols., 2004), una citoquina que regula la expresión de neurotrofinas y de sus receptores (Remy y cols., 2003; Schulte-Herbruggen y cols., 2005), participa en la inducción del crecimiento neurítico (Cho y cols., 2005; Song y cols., 2005), y es un agente neuroprotector en un modelo de isquemia en retina (Fontaine y cols., 2002). Por todo ello, es presumible pensar que, al igual que en el hígado, el TNF- α pudiera ser uno de los mediadores moleculares de las acciones del LGF en el SNC.

Por otro lado, nuestros estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la actividad del LGF en el SNC está mediada por la estimulación de las vías de señalización MAPK/ERK y PI3K/AKT y por la regulación de proteínas críticas para la supervivencia celular como son Bcl-2, P-AKT, y P-CREB (Calatrava, 2011; Gonzalo-Gobernado y cols., 2013).

En resumen, el LGF es un factor pleiotrópico, caracterizado químicamente como un complejo albúmina-bilirrubina, con propiedades antioxidantes capaz de estimular la proliferación celular y la regeneración tisular en diferentes patologías tanto hepáticas como extrahepáticas. En el SNC, el LGF ejerce un efecto neuroprotector y/o promotor del crecimiento axónico sobre las neuronas dopaminérgicas dañadas que podría ser extensible a otras neuronas en degeneración como las de la oliva inferior, y/o las neuronas de Purkinje en el caso de las ataxias cerebelosas. Independientemente de su posible acción neuroregeneradora, el LGF también podría ser efectivo en el tratamiento de la AF debido a su capacidad antioxidante, y su potente actividad sobre el sistema cardiovascular.

4. TERAPIA CELULAR EN ATAXIA.

Las terapias de reemplazo celular utilizando células madre son una prometedora alternativa para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo a los trastornos relacionados con el cerebelo (Bigini y cols., 2011; Erceg y cols., 2011; Kemp y cols., 2011; Zhang y cols., 2011). Se están realizando distintas aproximaciones con el fin de encontrar el tipo celular más adecuado para este tipo de terapias, aunque la necesidad de ahondar en el conocimiento básico de estas células no ha permitido aún establecer cuál es el tipo más apropiado para su uso en terapia humana.

Entre las distintos tipos celulares que se están ensayando cabe destacar los siguientes grupos celulares:

Las Células Madres Adultas, se denominan así por encontrarse en tejidos maduros. En el cerebro en concreto, derivan de la zona subventricular que abarca los ventrículos laterales del cerebro y de la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Doetsch y cols., 1999) y se denominan Células Madres Neurales Adultas (CMN). Estas células son capaces de diferenciarse en neuronas y glía y ser responsables de la homeostasis tisular y la regeneración durante la vida adulta. Además, su proliferación y diferenciación depende de señales específicas como citoquinas y factores de crecimiento (Bazan y cols., 2004; Reimers y cols., 2008). Sin embargo, estas células presentan una serie de desventajas para su utilización como su obtención, que al ser invasiva, las hace prácticamente inutilizables tanto para su estudio como para su uso en estas terapias. Otro inconveniente es su limitada capacidad de migración y diferenciación, requisitos necesarios para la terapia celular. Actualmente no han sido identificadas CMN en cerebelo de humano adulto aunque sí en el de conejo (Ponti y cols., 2008).

Las Células Madre Embrionarias (CME) se obtienen a partir de la masa celular interna de un blastocisto. Las ventajas que muestran para su utilización en terapia celular son su totipotencia, una elevada capacidad de proliferación así como una buena criopreservación. Pero las desventajas de su utilización, aparte de los problemas éticos, también son muchas ya que producir las líneas celulares es bastante ineficaz, así como la limitada disponibilidad de blastocistos humanos. Además tienen otros inconvenientes como la inmunosupresión durante la terapia por el trasplante alogénico y la capacidad tumorigénica de estas células en el huésped (Prosper y cols., 2006; Herranz y cols., 2010).

Tratando de mitigar los inconvenientes mostrados por estas poblaciones celulares, se han buscado nuevas fuentes de células madre y se han considerado las células madre de cordón umbilical humano (CMCUhu) como un candidato apropiado.

Con 130 millones de nacimientos al año en el mundo, las CMCUhu son actualmente la mayor población de células madre disponibles para la investigación biomédica y desarrollo clínico (Bigini y cols., 2011).

Su obtención no invasiva representa una gran ventaja sobre cualquier otro tipo de célula madre adulta o embrionaria. Ya que las CMCUhu pueden ser fácilmente caracterizadas, criopreservadas y su recolección esta éticamente aceptada se considera una de las fuentes más importantes de células madre tanto para futuras investigaciones como para su uso clínico.

4.1. Células Madre de Cordón Umbilical (CMCU).

La mayoría de células madre hematopoyéticas se encuentran en la circulación fetal, en la placenta y en el cordón umbilical.

El cordón umbilical contiene una mayor población de células madre hematopoyéticas que las presentes en la sangre periférica o la médula ósea y además se diferencian de ellas presentando unas características peculiares.

La sangre de cordón umbilical contiene un número mayor de poblaciones primitivas (Mayani y Lansdorp, 1998; Todaro y cols., 2000; Nayar y cols., 2002) con mayor actividad de telomerasa, lo que se asocia a un mayor potencial proliferativo. Este hecho se traduce en la regeneración de la hematopoyesis de un paciente empleando un menor número de células de cordón que si se usa medula ósea o sangre periférica.

Una de las peculiaridades de las CMCUhu reside en el hecho de que, aun siendo células madre adultas, todavía conservan algunas de las propiedades de célula madre embrionaria, tales como la expresión de los factores de transcripción Oct-4, Rex-1, Sox-2 y Nanog, los antígenos embrionarios específicos de estadio SSEZ-3 y SSea-4 y marcadores como TRA-1-60 y TRA-1-81 propios también de las células embrionarias (Zhao y cols., 2006).

Otra de sus características es la baja inmunogeneicidad manifestada por la débil expresión de antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad (Rubinstein y cols., 1998) y por la falta de capacidad estimuladora de la proliferación de linfocitos alogénicos (Zhao y cols.,

2006). Esta propiedad resulta claramente ventajosa en situaciones de utilización terapéutica alogénica, en las que cabe esperar una menor probabilidad de rechazo o de enfermedad de injerto contra huésped.

Aparte de las células madre hematopoyéticas, la sangre de cordón umbilical contiene otras poblaciones de células madre que le confieren un enorme interés desde el punto de vista de su potencial uso terapéutico (Broxmeyer, 2005), tales como las células madre mesenquimales (Dominici y cols., 2006), progenitores endoteliales (Bonanno y cols., 2007) y otras poblaciones como las “células madre muy pequeñas semejantes a las embrionarias” (Kucia y cols., 2008) y las células madre somáticas no restringidas (Kogler y cols., 2004).

- Uso terapéutico

Las células sanguíneas de cordón umbilical se utilizaron con éxito por vez primera en 1989 como un trasplante de medula ósea en un paciente con anemia de Fanconi (Gluckman y cols., 1989).

En los últimos años se ha mostrado, que son instrumentos versátiles para el tratamiento de distintos trastornos incluyendo las enfermedades neurodegenerativas por su plasticidad (1), su capacidad antiinflamatoria (2) y por la capacidad neuroprotectora y/o neurogénica (3).

(1).-Las células progenitoras hematopoyéticas son capaces de diferenciarse a células de distintos linajes incluyendo el neural (Sanchez-Ramos y cols., 2001; Sanchez-Ramos, 2002; Chen y cols., 2005).

La manipulación *in vitro* de estas células ha mostrado que después de tratarse con ácido retinoico y factor de crecimiento nervioso (NGF) expresaban marcadores moleculares característicos de neuronas y células de la glía (Sanchez-Ramos y cols., 2001). Además, si eran cultivadas con medio normal (DMEM) también expresan marcadores neurales como nestina, MAP2, y GFAP (Garbuzova-Davis y cols., 2006b).

La fracción mononuclear de células de cordón umbilical se caracterizó estudiando la expresión de antígenos hematopoyéticos y neurales durante el periodo de cultivo, sin la adición de factores como neurotrofinas, factores de crecimiento y citoquinas. Las células se clasificaron en dos poblaciones distintas: La fracción de células adherentes, (siendo la mayoría linfocitos que expresaban antígenos hematopoyéticos) y la fracción flotante, donde se encontraron un número significativo de antígenos marcadores de células

madre/progenitoras y de antígenos neurales. Los marcadores gliales tenían una mayor presencia en la población adherente y los marcadores neuronales en la población flotante, así como la coexpresión de marcadores hematopoyéticos y neurales en algunas células (Chen y *cols.*, 2005). De todas formas, la mejor demostración de que estas células adquieran el fenotipo neural sería un ensayo funcional en el cual se mostrara la actividad electrofisiológica, la formación de sinapsis y la liberación de neurotransmisores.

(2).-Los linfocitos del cordón umbilical expresan niveles más bajos de receptores de citoquinas proinflamatorias (Interleucinas-2, 4, 6 y 7, TNF- α e interferon C) que las células sanguíneas adultas (Zola y *cols.*, 1995) y producen más cantidad de la citoquina antiinflamatoria (IL-10) (Rainsford y Reen, 2002).

(3).-Las CMCUhu mejoran el microambiente del hipocampo de ratas adultas estimulando a las células neuronales presentes en este nicho neurogénico y tienen la capacidad de secretar factores tróficos que favorecen la supervivencia neuronal (Bachstetter y *cols.*, 2008; Chen y *cols.*, 2010).

Debido a estas características, las CMCUhu se han utilizado para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en distintos modelos experimentales (Garbuzova-Davis y *cols.*, 2006a; Herranz y *cols.*, 2010; Sanberg y *cols.*, 2011). Su eficacia se ha demostrado en la lesión de la médula espinal (Park y *cols.*, 2010), daño cerebral (Chen y *cols.*, 2001; Willing y *cols.*, 2003; Vendrame y *cols.*, 2005) enfermedad de Huntington (Ende y Chen, 2001; Ende y *cols.*, 2001), alzheimer (Ende y *cols.*, 2001; Nikolic y *cols.*, 2008) y esclerosis lateral amiotrófica (Chen y Ende, 2000). En todos ellos provocó una mejoría en los síntomas neurológicos y en la esperanza de vida, resultando su efecto beneficioso más bien debido a su capacidad para sintetizar y liberar factores tróficos involucrados en la supervivencia celular, que a su diferenciación en distintos tipos de células neurales (Chen y *cols.*, 2007; Arien-Zakay y *cols.*, 2009; Zwart y *cols.*, 2009).

Hipótesis y Objetivos

HIPOTESIS DE TRABAJO

Hoy en día no existe un tratamiento eficaz para las ataxias cerebelosas. El abordaje de la búsqueda de nuevas soluciones terapéuticas nos lleva a proponer la siguiente hipótesis de trabajo:

- 1.- Dado que el factor de crecimiento del hígado (LGF) tiene efectos pleiotrópicos con demostrada eficacia en el SNC, proponemos que la administración intraperitoneal de LGF podría ejercer efectos beneficiosos en dos modelos experimentales de ataxia cerebelosa, y que estos efectos están mediados por su capacidad neuroprotectora y por su actividad antioxidante.
- 2.- Por otro lado, dentro del ámbito de las terapias de reposición celular y teniendo en cuenta el efecto benefactor de los implantes de células madre de cordón umbilical humano (CMCUhu) en diversos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas, proponemos que los implantes de estas células provocarán la restauración funcional en los trastornos cerebelosos.

OBJETIVOS

- 1.- Desarrollo y puesta a punto de un modelo experimental de ataxia cerebelosa en rata, inducido por lesión química de las neuronas de la oliva inferior con 3-acetilpiridina (3-AP).
- 2.- Determinar el potencial terapéutico de la administración intraperitoneal de LGF en el modelo de ataxia cerebelosa inducido por 3-AP. Se analizará la coordinación motora y se determinará la capacidad neuroprotectora y/o neurogénica del LGF mediante el análisis de la expresión de marcadores específicos de las neuronas de la oliva inferior y de las células de Purkinje en el cerebelo. Además, se valorará la capacidad del LGF para prevenir la reactividad de las células de la glía, y para potenciar la expresión de proteínas involucradas en la supervivencia celular en el tronco del encéfalo y el cerebelo de las ratas atáxicas.

3.- Analizar la capacidad terapéutica del LGF en un modelo experimental de ataxia de Friedreich en ratón. Para ello se utilizarán ratones transgénicos humanizados de la estirpe FXNtm1MknTg (FXN)YG8Pook generados por el equipo del Dr. Mark Pook (Mahdawi y col., 2006). Como controles utilizaremos ratones de la estirpe C57BL/6J. Se analizará la coordinación motora y la expresión de marcadores específicos de neuronas y de glía en la médula espinal, el tronco del encéfalo y el cerebelo. Además, se valorará la capacidad del LGF para modular en el SNC y el corazón la expresión de la frataxina, del complejo IV de la cadena respiratoria y de proteínas involucradas en la supervivencia celular. Paralelamente, se estudiará el efecto del LGF sobre los niveles de glutatión en el músculo esquelético, y sobre el tamaño de los cardiomiocitos.

4.- Como terapia alternativa para el tratamiento de las ataxias cerebelosas, se ensayará el trasplante de células madre de cordón umbilical humano (CMCUhu). Se evaluará su funcionalidad *in vivo* estudiando la coordinación motora de los animales, la capacidad de las CMCUhu para integrarse y diferenciarse en el tejido huésped, y la efectividad de estas células para recuperar en el tronco del encéfalo y el cerebelo aquellos parámetros que se vean afectados en el modelo de ataxia cerebelosa inducido por 3-AP.

Material y Métodos

1. REACTIVOS.

1.1. Reactivos de uso general.

REACTIVO	CASA COMERCIAL
Ácido clorhídrico	Panreac
Cloruro potásico	Merck
Cloruro sódico	Sigma
PBS (pastillas)	Gibco
Hidróxido de sodio	Merck
Trizma base	Sigma

1.2. Reactivos para histología.

REACTIVO	CASA COMERCIAL
3,3-Diaminobencidina	Dako
Bisbencimida	Sigma
Citrato sódico	Merck
Complejo streptavidina–biotina–peroxidasa	Dako
p-fenilenodiamina	Sigma
Paraformaldehído	Merck
Sacarosa	Panreac
Suero normal de cabra	PAA
Tissue-Tek®	O.C.T™
Triton X-100	Sigma

1.3 Reactivos para bioquímica.

REACTIVO	CASA COMERCIAL
5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP)	BIO-RAD
Acetato magnésico	Merck
Acrilamida / Bisacrilamida	BIO-RAD
Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma
Antipaína	Sigma
Azul de bromofenol	Merck
Azul de nitrotetrazolio / x-fosfato (NBT)	BIO-RAD
β -mercaptoetanol	Panreac
β -glicerofosfato	Sigma
Benzamidina	Sigma
Blotto	GE Healthcare
Cloruro de Magnesio	Merck
DL-Ditiotreitol (DTT)	Sigma
Dodecil-sulfato-sódico (SDS)	Serva
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Glicerol	Sigma
Glicina	Sigma
Leupeptina	Sigma
Metanol	Merck
Molibdato sódico	Sigma
N-N-N'-N'-tetrametilen-diamina (TEMED)	BIO-RAD
Ortovanadato sódico	Sigma
Pepstatina A	Sigma
Persulfato amónico	Sigma
Tween-20	Sigma

2. MODELOS EXPERIMENTALES.

Todos los procedimientos descritos en esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo de acuerdo con la legislación española para el uso de animales de experimentación (RD 1205/2005) y han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

2.1 Modelo Experimental de ataxia cerebelosa.

Se utilizaron 196 ratas albinas hembras Sprague Dawley (SD) de unos 250g de peso. Los animales fueron estabulados en un ambiente con la temperatura controlada, bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con acceso a comida y bebida *ad libitum*. El modelo utilizado consistió en la destrucción selectiva de las neuronas de la oliva inferior mediante la administración i.p. de la neurotoxina 3-AP. Debido al papel crítico de la oliva en el funcionamiento del cerebelo, se ha utilizado la lesión de ésta estructura como un modelo experimental adecuado para el estudio de la ataxia cerebelosa (Desclin y Escubi, 1974; Balaban, 1985; Fernandez y cols., 1998).

Para valorar la dosis de neurotoxina más adecuada, se utilizaron 31 ratas SD de 250g de peso que recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de 3-AP en un rango de dosis que varió entre 15 y 60 mg/kg, estableciéndose la dosis de 40 mg/kg como la adecuada para el modelo experimental como se indica en el apartado 1.1 de los resultados.

2.2 Modelo experimental ataxia de Friedreich. Fxn^{tm1Mkn} / Tg (FXN) YG8Pook. (YG8R)

El ratón transgénico YG8R fue generado y caracterizado por el equipo de Dr. Mark A. Pook (Al-Mahdawi y cols., 2006). Actualmente, este ratón está considerado el mejor modelo animal de AF. Son ratones hemicigotos para el transgén Tg (FXN) YG8Pook (frataxina humana) y homocigotos para el alelo diana Fxn^{tm1Mkn} (frataxina). Es decir, portan el transgén para la frataxina humana mutada en AF, y suprimen el gen que codifica para la frataxina endógena de ratón. La mutación de la frataxina humana originada por la expansión específica de la repetición GAA, se acumula en el cerebro (cerebelo particularmente) de estos ratones de manera similar a la patología humana de la AF de

forma dependiente a la edad del ratón. Esta variedad se mantiene heterocigota para la mutación del alelo diana y hemicigota para el transgén (ratones viables y fértiles).

El ratón YG8R muestra una ataxia modesta pero la neuropatología descrita por los autores es similar a la encontrada en los pacientes humanos aunque menos pronunciada, observándose síntomas como descoordinación, degeneración neuronal en ganglios de la raíz dorsal, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial etc. (Al-Mahdawi y cols., 2006).

Para este trabajo se utilizaron 12 machos que se recibieron con dos meses de edad y se mantuvieron en nuestro estabulario hasta su uso en experimentación siguiendo las directrices de los Laboratorios Jackson (Jax).

3. PURIFICACION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL HIGADO (LGF).

El LGF se obtuvo de suero de ratas Wistar después de 5 semanas de ligadura del conducto biliar, valorándose la concentración del factor por HPLC (Singh y Bowers, 1986), y escogiéndose el suero de concentración más elevada para la purificación del LGF mediante tres pasos de cromatografía. Además se determinó la actividad *in vivo* del factor llevando a cabo la valoración de la estimulación de la síntesis de ADN en hígado de rata mediante incorporación de ³H-timidina (New England Nuclear). El procedimiento detallado ya fue publicado anteriormente (Díaz Gil y cols., 1994). La pureza de la preparación del LGF se comprobó por electroforesis en geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Las muestras del LGF se guardaron liofilizadas, conservándose cerradas al vacío a 4º C. En el momento de su utilización se disolvieron en suero salino estéril y se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) en los animales a una dosis de 5µg / rata en el modelo experimental de ataxia cerebelosa con 3-AP y de 1,7 µg /ratón en el modelo experimental YG8R.

4. OBTENCION Y CARACTERIZACION DE LAS CELULAS MADRE DE CORDON UMBILICAL HUMANO (CMCUhu).

4.1 Valoración, procesamiento y caracterización de las CMCUhu.

El procedimiento operativo de la valoración, procesamiento y criopreservación de los cordones que se describe a continuación fue llevado a cabo por el Dr. Alberto Richard responsable del banco de cordones del Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid.

Los cordones umbilicales humanos no aptos para su uso terapéutico fueron donados para investigación. Dichos cordones no se consideraron aptos ya que no reunían las características mínimas de celularidad y volumen (parámetros mínimos: 1.200 millones de leucocitos totales y un volumen de sangre de 60 ml) para el tratamiento de pacientes humanos, pero son suficientes para su uso en investigación. Se calculó la cantidad total de células mononucleares (linfocitos o monocitos) obteniéndose de valores medios:

Células Mononucleadas (CMN): $337,8 \times 10^6 \pm 32,56$.

Células nucleadas totales (CNT): $910,8 \times 10^6 \pm 86,77$.

CD34 (Antígeno de linaje hematopoyético): $0,7620 \times 10^6 \pm 0,09140$.

Una vez valorada la muestra, la sangre de cordón fue fraccionada con la finalidad de recuperar la mayor parte posible de las células nucleadas y los progenitores hematopoyéticos. Si la cantidad de células nucleadas era superior a 300 millones, se procedió a la congelación de la sangre de cordón umbilical mediante un descenso programado de la temperatura con una disolución crioprotectora apropiada (1:10/ DMSO: Rheomacrodex) de forma que asegurara la máxima viabilidad de los progenitores hematopoyéticos.

4.2 Aislamiento de CMCUhu del concentrado de células sanguíneas.

La sangre fue extraída de la bolsa y dividida en alícuotas de 30 ml en tubos Falcon a los que se añadió al fondo del tubo, con la ayuda de una jeringa, 15 ml de Lymphoprep™. Se centrifugó a 800 g durante 40 minutos a 20°C. En este paso se obtuvo un gradiente del que se tomó la banda de células mononucleadas localizadas en la interfase (de 2 a 7 ml) y se pasó a los posteriores lavados con PBS centrifugando y decantando el sobrenadante.

Finalmente se tomó una alícuota de 40 μ l y se realizó el conteo de las células viables por exclusión con *Trypan Blue* en cámara de Neubauer.

5. ADMINISTRACIÓN DE LGF E IMPLANTES CELULARES.

5.1 Administración intraperitoneal (i.p.) de LGF en el modelo de lesión con 3-AP.

La mayoría de los experimentos presentados en esta memoria se realizaron utilizando 82 ratas lesionadas con 3-AP (40 mg/kg) de 8 días de evolución al inicio del tratamiento. La administración del factor consistió en dos inyecciones i.p. semanales de LGF (5 μ g/rata) (grupo experimental 3-AP+LGF) ó de la disolución vehículo (suero salino) (grupo experimental 3-AP) durante 1 o 3 semanas (Fig. 1). Los animales que recibieron vehículo o LGF durante 1 semana fueron utilizados para los experimentos de microdiálisis descritos en el apartado 11 (Fig. 1C). Los animales que recibieron el tratamiento durante 3 semanas se mantuvieron durante un mes adicional tras el que fueron sacrificados. Este grupo fue destinado para los análisis bioquímicos e histoquímicos en cerebro, y para el estudio de la coordinación motora (Fig. 1A).

Para evaluar los efectos de la administración de LGF en estadios tempranos de daño neuronal se utilizaron 10 ratas lesionadas con 3-AP (40 mg/kg) de 3 días de evolución al inicio del tratamiento (Fig. 1B,). Los animales recibieron dos inyecciones i.p. semanales de LGF (5 μ g/rata) (3-AP+LGF) ó vehículo (grupo experimental 3-AP) durante 3 semanas, y se sacrificaron al finalizar el período de tratamiento. Este grupo de animales también fue destinado para los análisis bioquímicos e histoquímicos en cerebro, y para el estudio de la coordinación motora.

Todos los estudios conductuales, análisis histoquímico y determinaciones bioquímicas se realizaron en paralelo en un grupo de 35 ratas no lesionadas que recibieron dos inyecciones i.p. semanales de vehículo durante 1 o 3 semanas (grupo control).

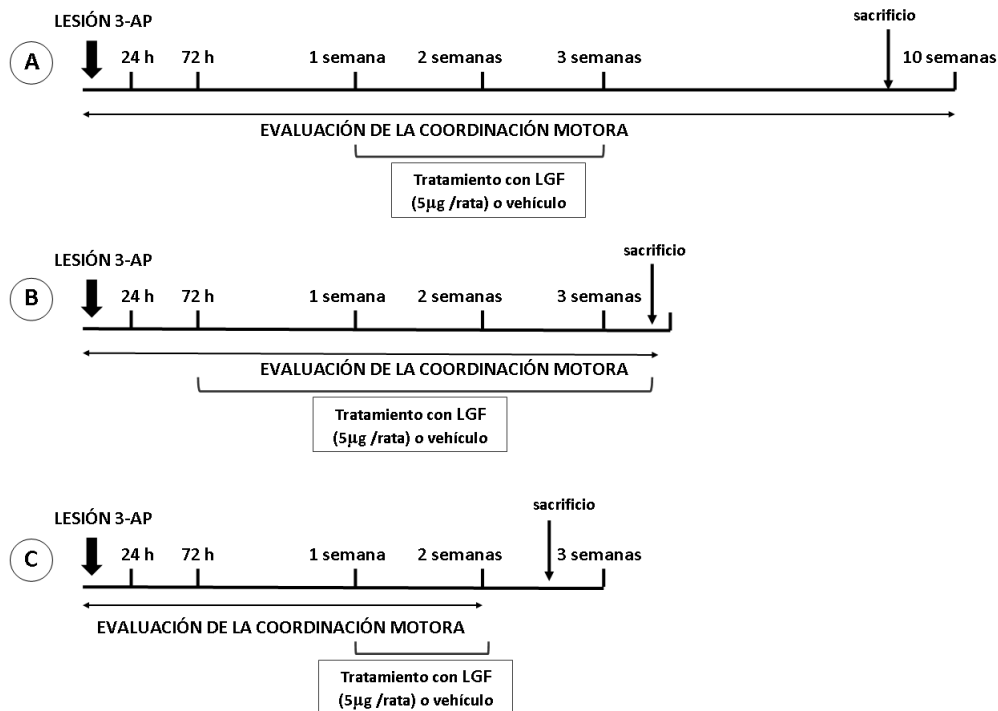


Figura 1.- Esquemas representativos de los protocolos de administración i.p. de LGF en ratas lesionadas con 3-AP. En A y C se muestra el grupo destinado al estudio bioquímico, histológico y conductual. En B se muestra el grupo destinado al estudio del efecto del LGF en tiempos más próximos a la lesión y en C se muestra el grupo destinado al experimento de microdiálisis cerebral.

5.2 Administración intraperitoneal de LGF en el modelo YG8R.

Para evaluar los efectos de la administración de LGF en la AF se utilizaron ratones YG8R de una edad comprendida entre los 6 y 7 meses al inicio del tratamiento. Los animales recibieron dos inyecciones i.p. semanales de LGF (1,7 µg/ratón) (grupo experimental YG8R+LGF) ó de vehículo (grupo experimental YG8R) durante 3 semanas, y se mantuvieron durante un mes adicional tras el que fueron sacrificados (Fig. 2). Todos los estudios conductuales, análisis histoquímico y determinaciones bioquímicas se realizaron en paralelo en un grupo de ratones salvajes (WT) que recibieron dos inyecciones i.p. semanales de vehículo durante 3 semanas (grupo control).

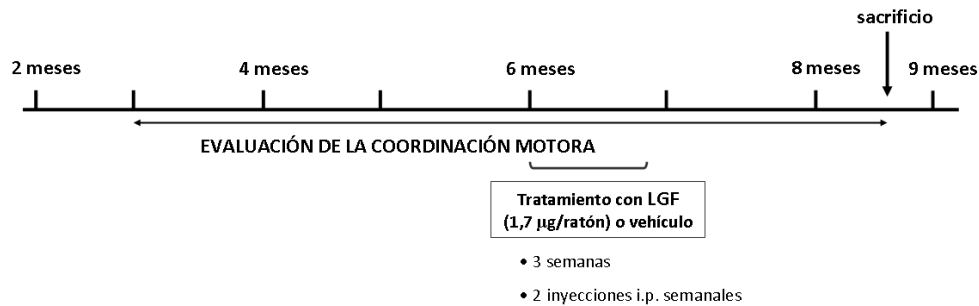


Figura 2.- Esquema representativo de la administración i.p. de LGF en los ratones YG8R.

5.3 Administración intravenosa de CMCUhu en el modelo de lesión con 3-AP.

Los animales utilizados para el tratamiento de CMCUhu, cursaban una lesión de 3 días de evolución con la neurotoxina 3-AP (40 mg/kg) al inicio del tratamiento.

Antes de iniciar la cirugía, las ratas lesionadas con 3-AP fueron dormidas mediante anestesia inhalatoria (Isoflurano 2%). Una vez anestesiado el animal, se canuló la vena lateral de la cola utilizando un catéter de 22G x 1" (Smiths Medical International Ltd.) por el que se inyectaron, en un volumen de 200 µl, las CMCUhu en una cantidad aproximada de 4 millones de células por rata (grupo experimental 3-AP+CMCUhu) o suero salino (grupo experimental 3-AP) (Fig.3).

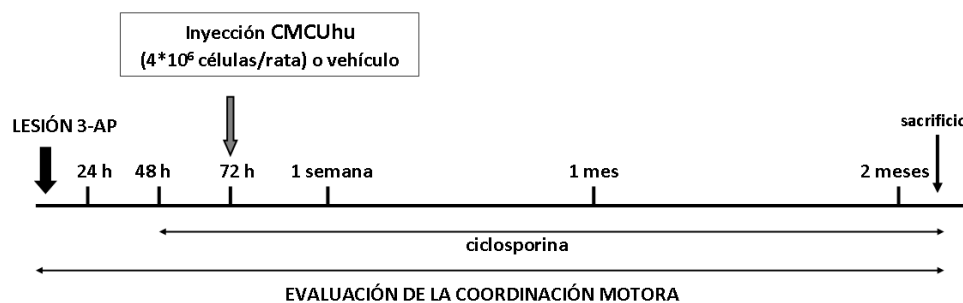


Figura 3.- Esquema representativo de la administración intravenosa de CMCU.

Un día antes de la administración de las CMCUhu los animales comenzaron a recibir una inyección i.p. diaria de ciclosporina (Sandommun Neoral 100 mg/ml, Novartis farmacéutica) a una dosis de 5mg/Kg/día que se mantuvo hasta la fecha de sacrificio de los animales. Para los análisis de inmunohistoquímica los animales se sacrificaron a los 48 horas, 7, y 21 días post-inyección de las CMCUhu. Para los estudios bioquímicos los animales se sacrificaron a los dos meses post- inyección de las CMCUhu (Fig. 3).

6. ESTUDIO DE COMPORTAMIENTO.

Evaluación de la coordinación motora (test rota-rod).

La coordinación motora se evaluó utilizando un rota-rod (PanLab S.L., Mod. LE 8500, Cornellá, España), que consiste en una barra con rotación motorizada sobre la que se sitúa al animal perpendicular al eje mayor de la barra con la cabeza orientada en sentido contrario al de la rotación. Antes de iniciar las evaluaciones los animales recibieron sesiones de entrenamiento para familiarizarse con la prueba. En cada sesión, se realizaron 3 valoraciones del tiempo de permanencia de cada animal en la barra a velocidad constante (4 r.p.m. durante 3 minutos), y otras 3 con aceleración progresiva (incremento de 4 a 40 r.p.m. en 30 segundos) durante un tiempo máximo de un minuto. Los animales que durante el período de entrenamiento permanecieron en el rota-rod el máximo tiempo, tanto a velocidad constante como durante la aceleración, fueron seleccionados para ser lesionados con 3-AP y formar parte de los posteriores experimentos de administración i.p. de LGF y de la administración intravenosa de CMCUhu. A las 24 y 72 horas post-lesión con 3-AP se llevó a cabo la evaluación de la coordinación motora, seleccionándose para el tratamiento con LGF o CMCUhu solo aquellos animales en los que disminuyó el tiempo de permanencia en aceleración entre un 30 y un 50%. Una vez iniciados los distintos tratamientos, se realizó un test de coordinación motora a la semana hasta el sacrificio de los animales, siguiendo los mismos parámetros tanto de aceleración como de velocidad constante usados durante el período de entrenamiento.

En los ratones YG8R la evaluación de la coordinación motora comenzó a los 3 meses de edad. Los parámetros utilizados fueron similares a los realizados con las ratas con ataxia cerebelosa a excepción del tiempo de aceleración que se incrementó de 4 a 40 r.p.m. en 1 minuto. Para el entrenamiento de los animales se realizaron 2 pruebas a la semana y a partir de ese momento se evaluaron 1 vez por semana hasta el sacrificio de los animales.

7. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

La Bromodeoxiuridina (BrdU) es un análogo de la deoxitimidina que se intercala en el ADN en síntesis, por lo que nos permite marcar las células que estén proliferando en un tejido durante el periodo en el que se inyecta este compuesto al animal *in vivo*. Posteriormente se procesa el tejido para la detección inmunohistoquímica de las células marcadas con un anticuerpo anti-BrdU (ver apto. 8.2.1).

Para determinar si la lesión con 3-AP era capaz de incrementar la proliferación celular tanto en el cerebelo como en el tronco cerebral, dos grupos experimentales de animales recibieron inyecciones i.p. diarias de BrdU (Sigma) (50 mg/Kg). En el primer grupo el inicio de las inyecciones fue a los 3 días post-lesión (fase más próxima a la lesión) y en el segundo grupo, a los 8 días post-lesión. Una vez transcurridos 15 días desde el comienzo de las inyecciones de BrdU los animales se sacrificaron para el estudio inmunohistoquímico del cerebro.

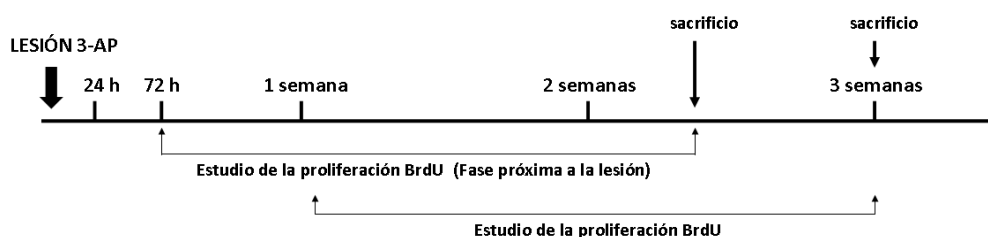


Figura 4.- Esquema representativo del estudio de la proliferación celular tras la lesión con 3-AP.

8. HISTOLOGÍA.

8.1 Procesamiento del tejido.

Las ratas lesionadas con 3-AP fueron anestesiadas con 0.6-0.8 ml/rata de una mezcla de 0.5 ml de ketamina (50mg/ml; Grupo Pfizer, Parke Davis SL, Madrid), 0.4 ml de Valium (4mg/ml; RocheFarma S.A., Madrid) y 0.1 ml de atropina (1mg/ml; B. Braun Medical S.A., Madrid). Posteriormente fueron perfundidas vía aorta ascendente con 50 ml de salino isotónico heparinizado, seguidos de 250 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino 0,1 M (PBS) pH 7,4. A continuación se extrajeron los cerebros, y de cada uno se

disecionó transversalmente la porción correspondiente al tronco del encéfalo y cerebelo. Las piezas disecionadas fueron postfijadas a 4°C en la misma disolución durante 24 horas, y sumergidas secuencialmente en sacarosa al 10%, 20% y 30% en PBS 0,1 M (pH 7,4) a 4° C para su crioprotección. Las piezas fueron cubiertas con Tissue-Tek® y rápidamente congeladas en hielo seco picado. De cada pieza se realizaron secciones coronales de 20 µm de grosor en el criostato (Microm, Mod. HM 550, Walldorf, Alemania), que se montaron sobre portas tratados con carga positiva (DakoCytomation, Dinamarca).

En el caso de los ratones YG8R se procesaron histológicamente solo las médulas, ya que los cerebros se emplearon para el estudio bioquímico. Por este motivo no se fijaron los animales por perfusión, sino que se aislaron las columnas vertebrales con las médulas en su interior, y se fijaron por inmersión durante 4 días en paraformaldehído al 4%. Las columnas vertebrales se seccionaron en un segmento anterior correspondiente a la médula cervical, un segmento intermedio correspondiente a la médula torácica y un segmento posterior correspondiente a la médula lumbar y sacra. Con el fin de poder preservar los ganglios de la raíz dorsal no se extrajeron las médulas de la columna vertebral, sino que se mantuvieron *in situ*, y se descalcificaron las columnas vertebrales con la disolución DC2 (ácido clorhídrico y EDTA) (Labonord, Krape) durante 2 horas. Tras sucesivos lavados en PBS, las piezas se deshidrataron en una batería de alcoholes de concentración creciente, se aclararon con Xilol y fueron incluidas en parafina. Se realizaron secciones coronales de 8 µm de grosor en el microtomo (Microm, Mod. HM 325, Walldorf, Alemania) de los 3 segmentos seleccionados de cada médula, que se montaron sobre portas tratados con carga positiva (DakoCytomation, Dinamarca).

8.2 Inmunohistoquímica.

8.2.1 Anticuerpos.

Los anticuerpos primarios utilizados están descritos en la tabla 1. Los anticuerpos secundarios empleados fueron los siguientes: anti-IgG de ratón biotinilado y anti-IgG de conejo biotinilado (ambos sin diluir) (Zymed, Invitrogen Corporation CA, USA), anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor-568 (1/400) (Molecular Probes, Eugene, OR), anti-IgG de

conejo conjugado a Alexa Fluor-488 (1/400) (Molecular Probes), anti-IgG de rata conjugado a Alexa Fluor-488 (1/400) (Molecular Probes), anti-IgG de ratón conjugado a Fluoresceína (1/20) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) y anti-IgG de cobaya conjugado a Cy2 ó Cy3 (1/500) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.).

Anticuerpo 1º	Tipo	Dilución	Casa Comercial
β -Tubulina III	Policlonal de conejo	1/500	BabCO.
<i>B-cell lymphoma 2</i> (Bcl2)	Monoclonal de ratón	1/25	Santa Cruz Biotech.
Bromodeoxiuridina (BrdU)	Monoclonal de raton	1/25	Dako Cytomation.
Calbindina	Policlonal de conejo	1/500	Millipore.
Doble cortina (Dcx)	Policlonal de cobaya	1/3000	Chemiconl.
Frataxina (FXN)	Monoclonal de ratón	1/100	Millipore.
Ferroportina (FPN)	Policlonal de conejo	1/100	Bioss Inc.
Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)	Policlonal de conejo	1/200	Dako Cytomation.
Receptor 1 de Glutamato (GluR1)	Policlonal de conejo	1/1000	Millipore.
Antígeno Leucocitario Humano (HLA-ABC)	Monoclonal de ratón	1/100	AbD Serotec.
Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba1)	Monoclonal de ratón	1/300	Wako
Nestina	Monoclonal de ratón	1/20	D.S. Hybridoma Bank.
Antígeno Nuclear Neuronal (NeuN)	Monoclonal de ratón	1/800	Chemicon.
Antígeno Nuclear de Células Proliferantes (PCNA)	Policlonal de conejo	1/50	Santa Cruz Biotech.
Anticuerpo frente al Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (OX6)	Monoclonal de ratón	1/250	AbD Serotec.
Anticuerpo frente a oligodendrocitos (RIP)	Monoclonal de ratón	1/1000	Chemicon.

Tabla 1.- Anticuerpos primarios empleados en Inmunofluorescencia e Inmunoperoxidasa.

8.2.1 Técnica inmunohistoquímica.

Las secciones fueron lavadas en PBS (pH 7,4) y tratadas con tampón de desenmascaramiento de antígeno citrato sódico 10mM (pH 6,0) a 95° C durante 3

minutos en el caso de las secciones de criostato, o en olla exprés durante 3 minutos en el caso de los cortes de parafina. Posteriormente se preincubaron en una disolución de bloqueo compuesta por suero normal de cabra al 5% en tampón PBS/ Tritón-X 100 al 0,1% durante 30 minutos.

Los anticuerpos primarios fueron aplicados durante 24 horas a 4°C y la mayoría de ellos fueron visualizados siguiendo el procedimiento de inmunofluorescencia. Para ello se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos contra las inmunoglobulinas de las especies en las cuales se obtuvieron los anticuerpos primarios.

Los anticuerpos primarios contra nestina, NeuN, calbindina, Bcl-2, frataxina y ferroportina fueron visualizados mediante el procedimiento de inmunoperoxidasa. Para ello se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (DakoCytomation, Denmark) y posteriormente con el complejo streptavidina–biotina–peroxidada (DakoCytomation). El complejo unido al tejido fue visualizado utilizando Diaminobencidina (DAB) como sustrato de la peroxidasa (DAB+Substrate-Chromogen System, DakoCytomation, Denmark). Para llevar a cabo la inmunodetección de Bromodeoxiuridina (BrdU), las secciones fueron tratadas con HCl 2N a 37°C durante 30 minutos y lavadas en tampón PBS antes de la incubación con la disolución de bloqueo, prosiguiendo después con la técnica de inmunofluorescencia descrita anteriormente. Una serie de secciones fueron procesadas para la detección de microglía/macrófagos. Las secciones fueron incubadas con disolución de bloqueo y posteriormente con isolectina B4 (IB4) conjugada a peroxidasa (1/20) (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO) durante 2 horas. Finalmente, el producto de la reacción fue detectado con Diaminobencidina. Las secciones fueron cubiertas con un medio de montaje que contenía p-fenilenodiamina y bisbencimida (Hoechst 33342, Sigma) para la detección de los núcleos celulares.

8.3 Tinción con FluoroJade B para la detección de neuronas en degeneración.

Las secciones cerebrales fueron teñidas con FluoroJade B según el protocolo descrito por Schmued y cols (Schmued y Hopkins, 2000). Brevemente, los cortes de criostato se introdujeron en una estufa a 50° C hasta estar completamente secos. Posteriormente se sumergieron en una disolución de hidróxido sódico al 1% en alcohol al 80 % durante 5 minutos. Seguidamente se trataron 2 minutos con alcohol al 70% y 2 minutos con agua

destilada. A continuación se transfirieron a una disolución de permanganato potásico al 0,06% durante 30 minutos, y posteriormente se realizaron varios lavados en agua destilada. La disolución de marcaje se preparó a partir de una disolución madre de FluoroJade B (0,1 mg/ml) (Chemicon, Temecula, CA) que se diluyó al 0,01%. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, se retiró el exceso de líquido y se colocaron los portas en una estufa a 50º C hasta el secado completo. Finalmente, los cortes se sumergieron en Xilol durante 2 minutos antes de su montaje con DEPEX (Sigma, Chem Co, St louis, MO).

8.4 Análisis Morfométrico.

Para la estimación cuantitativa, se utilizó un microscopio Olympus Bx51 (Olympus, Ballerup, Dinamarca) junto con el sistema de análisis estereológico computarizado CASTGRID (Olympus, Ballerup, Dinamarca).

8.4.1 Análisis morfométrico para la cuantificación de las neuronas en la oliva inferior y en los núcleos profundos del cerebelo de ratas atáxicas.

Con el fin de estudiar la oliva inferior se realizaron cortes coronales en criostato de 20µm de grosor a lo largo de la mayor parte de su longitud (Fig.5D). Para el análisis morfométrico, se seleccionaron cortes de 3 niveles de la oliva en sentido antero-posterior, separados entre sí por una distancia aproximada de 400 µm. Como muestra la Fig.5, en los niveles 1 y 2 se visualizan los dos pliegues de la oliva principal (OP), mientras que en el nivel 3 se detectan los pliegues horizontal y vertical de la oliva accesoria medial (OAM). En los tres niveles se visualizan los pliegues de la oliva accesoria dorsal (OAD). Estos niveles se corresponden con las coordenadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1997) siguientes: -11.96 mm (nivel 1), -12.80 mm (nivel 2) y -13.30 mm (nivel 3) desde Bregma.

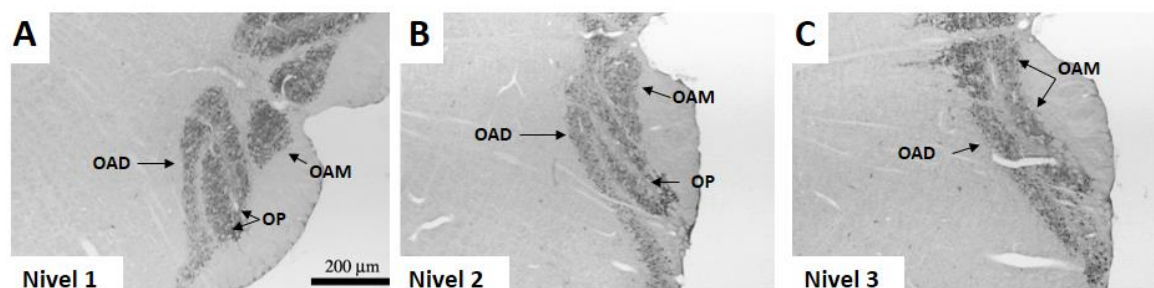


Figura 5.- *Inmunodetección de calbindina en la oliva inferior de la rata sana.* En A, B y C se muestran cortes coronales del tronco cerebral de la rata sana en los niveles 1, 2 y 3 a lo largo del eje longitudinal de la oliva inferior. La visualización de las neuronas de la oliva con el inmunomarcaje para calbindina (negro) pone de relieve la característica forma de la oliva en los tres niveles seleccionados. OAD: oliva accesoria dorsal; OAM: oliva accesoria medial; OP: oliva principal. Barra de escala: A-C (200μm).

Para la estimación cuantitativa de neuronas y microglía en la oliva inferior, el área de la oliva inferior en el nivel 2 fue perfilada y medida en cada sección coronal usando el objetivo 10X, con el fin de asegurar que las áreas de los distintos animales analizados fueran comparables. El número de células fue valorado dentro del área delimitada usando el objetivo 20X y fue expresado como células positivas/sección.

Para el estudio histológico del cerebelo se analizaron 3 niveles (C1-C3) en sentido antero-posterior. En el nivel C1 se visualizaron los núcleos profundos en su mayor extensión (-11,30 a -11,60 mm desde Bregma); en los niveles C2 (-12,30 mm desde Bregma) y C3 (-13,20 mm desde Bregma) se analizaron porciones más posteriores del cerebelo, en las que se distribuyen una gran parte de las fibras trepadoras de los axones procedentes del nivel 2 de la oliva (Fig. 5).

La estimación cuantitativa del número de neuronas calbindina-positivas en los núcleos profundos del cerebelo se realizó en los cortes del nivel C1 especificado arriba. Se tomaron imágenes panorámicas de los 3 núcleos profundos (fastigial, interpuesto, y dentado) de cada hemisferio del cerebelo, utilizando el objetivo 10x y la función de fotocomposición del software de Nikon *NIS elements*, acoplado a un microscopio Nikon Eclipse Ti-e equipado con una cámara Nikon DS-2MV. Las células positivas para calbindina se expresaron como células positivas /sección.

8.4.2 Análisis morfométrico para la cuantificación de neuronas y células de microglía de la médula espinal de los ratones YG8R.

Para el estudio de los ganglios de la raíz dorsal y la médula espinal se analizaron cortes coronales de 8 μm de grosor de los 3 niveles seleccionados de cada médula (cervical, torácica y lumbar). Para la estimación cuantitativa de las neuronas y células de la microglía de la sustancia gris se tomaron imágenes panorámicas de la sustancia gris de cada región de la médula, utilizando el objetivo 10x y el mismo software y microscopio descrito en el párrafo anterior. Se determinó el área correspondiente a la sustancia gris en los 3 niveles de la médula espinal, y el número de neuronas NeuN-positivas y de células de microglía IB4-positivas presentes en esta área fue expresado como células positivas/ mm^2 .

9. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.

9.1 Preparación de extractos tisulares.

9.1.1 Disección del tejido.

Los animales se anestesiaron con una mezcla de oxígeno e isoflurano al 4% y a continuación se sacrificaron por decapitación con guillotina. Rápidamente se extrajo el cerebro para su procesamiento y se diseccionaron las distintas regiones cerebrales siguiendo la metodología descrita por Carlsson y Lindqvist (Carlsson y Lindqvist, 1973). En las ratas lesionadas con 3-AP las estructuras diseccionadas fueron cerebelo y tronco. En el caso de los ratones YG8R las estructuras diseccionadas fueron cerebelo, tronco, corteza, médula y una porción del corazón. Una vez obtenido el tejido, se procesó inmediatamente o se almacenó a -80°C para su posterior utilización. La manipulación del tejido y el procesamiento posterior se realizó siempre a 4°C .

9.1.2 Procesado del tejido.

Los distintos tejidos se homogeneizaron manualmente con un homogeneizador vidrio-vidrio tipo *Dounce* en proporción 1:8 (p:v) empleando un tampón de homogeneización isotónico (pH 7,6) compuesto por Tris-HCL 20 mM, KCl 140 mM, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 5mM, DTT

1 mM, EDTA 1 mM, EGTA 2 mM, Tritón X-100 al 0,5%, pepstatina A 10 µg/ml, leupeptina 10 µg /ml, antipaína 10 µg/ml, benzamidina 2 mM, β-glicerofosfato 20 mM, molibdato sódico 20 mM y ortovanadato sódico 200 µM.

El tejido homogeneizado en tampón isotónico se centrifugó a 11.000g a 4°C durante 20 minutos (Centrífuga eppendorf, Mod. 5415R, Alemania) y se separó el sobrenadante. Posteriormente, se hicieron alícuotas que se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

9.2 Determinación de la concentración de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el método de BCA (BCA protein assay kit, Pierce). El ensayo de BCA combina el principio de la reducción por parte de las proteínas del ión Cu^{+2} a ión Cu^{+1} en presencia de medio alcalino (reacción de Biuret) con la alta sensibilidad de detección colorimétrica de los cationes Cu^{+1} por el ácido bicinconínico (BCA). El producto de la reacción de este ensayo se forma por la interacción de dos moléculas de BCA con una molécula de ión cuproso Cu^{+1} . Este compuesto presenta absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. Se realizó una curva patrón con albúmina de suero bovino (BSA) 2 mg/ml con concentraciones crecientes desde 62,5 µg/ml hasta 2 mg/ml. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos en un horno de hibridación (Stuart Scientific, Mod. SI20 H, Reino Unido). Las medidas espectro-fotométricas se realizaron en un lector de placas automático (Tecan, Mod. F200, Grödig, Austria).

9.3 Técnicas de separación y análisis de proteínas (western blot).

9.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La electroforesis en geles de poliacrilamida se llevó a cabo utilizando un sistema de electroforesis analítica vertical de proteínas (BIO-RAD, Mod. Tetra Cell, California, EEUU). Para llevar a cabo la electroforesis disociante se emplearon geles de poliacrilamida de 1 mm de grosor en presencia de dodecil-sulfato-sódico (SDS) al 0,1%. Como agentes polimerizantes se utilizaron N-N-N'-tetrametilen-diamina al 0,86% y persulfato amónico 2,14 µg/µl. Las muestras se prepararon en el tampón de carga (Tris-HCl 60 mM, SDS 3%, β-mercaptoetanol 2%, glicerol 5% y azul de bromofenol 0,0083%) (pH 6,8). Se

cargaron 30 µg de proteína de cada muestra y se resolvieron a 200 V durante 1 hora utilizando una fuente de alimentación (BIO-RAD, Mod. Power Pack Basic, California, EEUU). El tampón empleado para desarrollar la electroforesis fue Tris-Glicina (Tris 250 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1%) (pH 8,3).

9.3.2 Transferencia a membrana.

Las proteínas separadas por electroforesis (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa de 0,45 µm (Hybond-ECL, GE Healthcare).

El sistema de transferencia utilizado fue un sistema de transferencia continuo y en húmedo (BIO-RAD, Mod. Mini Trans-blot module, California, EEUU) en el que se utilizó el tampón: Tris-Glicina/Metanol (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%) (pH 8,3). El sistema se preparó de la siguiente manera: con todos los elementos sumergidos en tampón de transferencia, sobre el ánodo se colocó una esponja, a continuación cuatro papeles de transferencia seguidos del gel, la membrana de Nitrocelulosa (previamente embebida en tampón de transferencia), otros cuatro papeles de transferencia y otra esponja. La cubeta se llenó de tampón y la transferencia del sistema se realizó durante 1 hora a voltaje constante de 100V y a 4º C usando una fuente de alimentación (BIO-RAD, Mod. Power Pack Basic, California, EEUU).

9.3.3 Inmunodetección.

Una vez que las proteínas se han resuelto y transferido correctamente, se detectan mediante el uso de anticuerpos específicos detallados en la tabla 2.

Anticuerpo 1º	PM (KDa)	Tipo	Dilución	Casa Comercial
Akt	60	Policlonal de conejo	1/2000	Cell Signaling
Akt ^(Ser473P)	60	Policlonal de conejo	1/2000	Cell Signaling
β-Actina	42	Monoclonal de ratón	1/5000	Sigma Aldrich
Proteína X asociada a Bcl-2 (Bax)	23	Policlonal de conejo	1/300	Santa Cruz Biotech
B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)	29	Monoclonal de ratón	1/400	Santa Cruz Biotech
Calbindina	28	Policlonal de conejo	1/5000	Millipore
Complejo IV (CIV)	35	Monoclonal de ratón	1/1000	Invitrogen
Doble cortina (Dcx)	45	Policlonal de cobaya	1/3000	Chemicon
Frataxina (FXN)	18	Monoclonal de ratón	1/1000	Millipore
Ferroportina (FPN)	63	Policlonal de conejo	1/1000	Bioss
GAPDH	37	Monoclonal de ratón	1/5000	Sigma Aldrich
Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)	50	Policlonal de conejo	1/5000	Dako
Receptor 1 de Glutamato (GluR1)	110	Monoclonal de ratón	1/5000	Millipore
Transportador de Glucosa 5 (Glut-5)	55	Policlonal de conejo	1/500	Abcam
Antígeno Nuclear Neuronal (NeuN)	44-46	Monoclonal de ratón	1/2000	Millipore
OX6	29	Monoclonal de ratón	1/1000	AbD Serotec
Antígeno Nuclear de Células Proliferantes (PCNA)	36	Policlonal de conejo	1/1000	Santa Cruz Biotech

Tabla 2.- Anticuerpos primarios empleados en western blot. (PM: Peso molecular).

9.3.4 Revelado por quimioluminiscencia.

La membrana de nitrocelulosa, antes ser incubada con el anticuerpo primario, se bloqueó durante 1 hora con blotto al 5% en PBS 0,1 M (pH 7,4). Los anticuerpos fueron diluidos en PBS-blotto al 1% y se incubaron con la membrana toda la noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-IgG de ratón (1/2000) (GE Healthcare), anti-IgG de ratón (1/2000) (Sigma), anti-IgG de conejo (1/2000) (GE Healthcare) o anti-IgG de cobaya (1/3000) (Rockland) conjugados a peroxidasa, se diluyeron en PBS-blotto al 1% y se

incubaron con la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente. Entre las incubaciones con los anticuerpos y antes del revelado, la membrana se lavó 3 veces durante 10 minutos con Tween 0,05% en PBS 0,1 M (pH 7,4).

Para desarrollar el revelado, se utilizó el procedimiento y los reactivos recomendados por el fabricante de ECLTM (GE Healthcare), Bio-Rad Immun-Star HRP Substrate ó Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate. Se empleó un sistema de quimioluminiscencia en el que la emisión de la luz es captada en una placa fotográfica (Amersham HyperfilmTM ECL). Después de llevar a cabo diferentes tiempos de exposición de la membrana, la película se introdujo en una reveladora automática (Fujifilm, Mod. FPM-100A, Tokio, Japón).

9.3.5 Revelado del control de carga con fosfatasa alcalina.

Para llevar a cabo la inmunodetección de la proteína β -Actina (control de carga), se bloqueó la membrana con BSA al 5% en PBS 0,1 M (pH 7,4) durante 1 hora. El anticuerpo primario anti- β -Actina (Sigma) (1/5000) se diluyó en PBS-BSA al 1% para la incubación de la membrana durante una hora a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido (1/5000) en PBS-BSA al 1% con el que se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó 3 veces durante 10 minutos con PBS-Tween al 0,05% entre las incubaciones con los anticuerpos.

La actividad fosfatasa alcalina se reveló con azul de nitrotetrazolio/x-fosfato (NBT) 0,3 mg/ml y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) 0,15mg/ml, ambos diluidos 1/100 en tampón AP (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM) (pH 9,5). La reacción se detuvo con H₂O MilliQ®.

9.3.6 Re-inmunodetección.

Para los experimentos en los que se necesitó detectar varios anticuerpos en la misma membrana, como en los casos de detección de los niveles fosforilados y totales de una proteína, antes de proceder a la re-inmunodetección, se incubó la membrana durante 45 minutos a 50°C con Glicina 1M, pH 3,1 para eliminar el anticuerpo primario y secundario de la primera inmunodetección.

9.3.7 Análisis densitométrico.

Una vez detectadas las bandas correspondientes a las proteínas de interés, se realizó su análisis empleando un analizador de imagen equipado con el paquete informático Image Quant TL (GE Healthcare, Reino Unido). Los datos se obtuvieron en unidades de densidad óptica/mm² y fueron corregidos por el control de carga (β -actina o GAPDH). Los datos correspondientes a fosforilación siempre se expresaron relativos a la cantidad total de la proteína estudiada.

10. ANÁLISIS CONCENTRACION GLUTATION EN MUSCULO.

Los niveles de glutatión se midieron siguiendo el protocolo descrito por Tietze y cols. (Tietze, 1969). Se trata de un ensayo enzimático basado en la oxidación de la forma reducida de glutatión por el compuesto 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB), el DTNB al reducirse en esta reacción, incrementa su absorbancia a 412 nm. Por la acción de la enzima glutatión reductasa (GR) se recicla el glutatión oxidado (GSSG) para dar glutatión reducido (GSH) y se repite el proceso incrementando la absorbancia a 412 nm en cada ciclo.

Las muestras preparadas en ácido perclórico (PCA) 0,4 N se neutralizaron con 4 volúmenes de un tampón Na₂HPO₄ 0,2M, NaH₂PO₄ 0,2M y EDTA 0,5M, pH 7,5. De esta muestra se realizó otra dilución en 9 volúmenes de un tampón que contenía 8 ml de tampón Na₂HPO₄ 0,2M, NaH₂PO₄ 0,2M y EDTA 0,5M, pH 7,5 y 2 ml de PCA 0,4 N. Se recogieron 50 μ l y se añadieron DTNB (6 mM), NADPH (0,35 mM) y glutatión reductasa (GR). La reacción enzimática se monitorizó en un lector de placas automático (Tecan, Mod. F200, Grödig, Austria) midiendo la absorbancia a 412 nm durante 6 minutos (13 medidas cada 30 segundos). Se realizó en paralelo una curva patrón de GSH con concentraciones crecientes de 6,25 hasta 200 ng.

El GSSG se determinó por el método de Griffith (Griffith, 1980). Después de la extracción con PCA y posterior neutralización del pH, el GSH se derivatizó con 2-vinilpiridina durante 1 hora, impidiendo así que reaccionase con el DTNB. El GSSG presente en las muestras es reducido a GSH por la GR. Este GSH es capaz de reducir el DTNB, obteniéndose así la

concentración de GSSG. Los niveles de glutatión reducido se calcularon restando del glutatión total el glutatión oxidado. La concentración se expresó en ng/mg tejido.

11. MICRODIÁLISIS.

11.1 Reactivos y materiales.

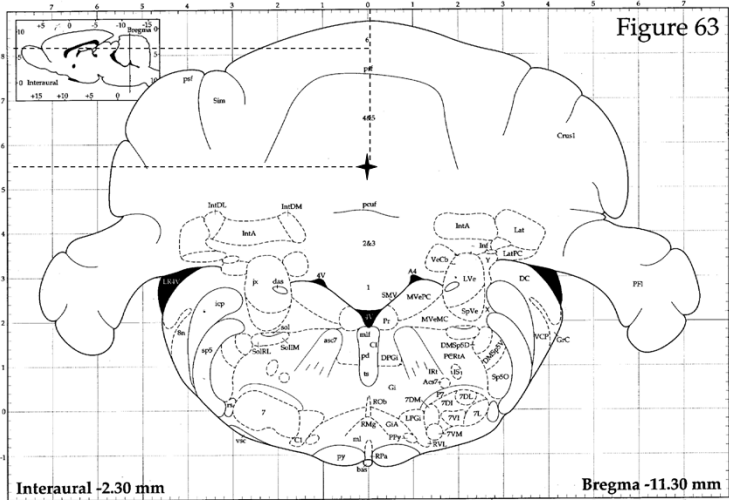
El medio de perfusión estándar fue una disolución Krebs-Ringer suplementado con bicarbonato (KRB) compuesta por (en mM): 122 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 0,4 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄ y 1,2 CaCl₂, preparándola siempre el mismo día del experimento. El medio de perfusión con alto contenido en K⁺ (75mM) se preparó reduciendo de forma equimolar la concentración de NaCl, de manera que la disolución resultante fuese isoosmótica.

Todas las disoluciones fueron preparadas con agua destilada y desionizada obtenida de un sistema de purificación de agua (Milli-Q Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). La osmolaridad de los medios de perfusión fue determinada por un micro-osmómetro (Advanced Instrument Mod.3MO, Norwood, MA, U.S.A.). El valor medio del KRB fue 285 ± 1 mOsm (n=7) y del KRB-75mM KCl fue 281 ± 2 mOsm (n=7).

11.2 Animales y procedimiento quirúrgico

Para los experimentos de microdiálisis se utilizaron 7 ratas sanas, cuyo peso estuvo comprendido entre 200 y 280 g (grupo control) y 9 ratas lesionadas con 3-AP (40 mg/kg), de 8 días de evolución, que recibieron 2 inyecciones i.p de LGF (grupo 3-AP+LGF) o vehículo (grupo 3-AP) durante una semana.

Para proceder a la cirugía, los animales fueron anestesiados con Isoflurano al 2%. Posteriormente la cabeza de los animales se inmovilizó fijándola al arco estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, U.S.A.). A continuación se practicó una incisión anteroposterior de la piel sobre la línea media de la calota, desde unos milímetros anterior al bregma hasta unos milímetros posterior al lambda, liberándose el cráneo de su periostio y desinsertando las aponeurosis de los músculos temporales en su región más dorsal. Tras la fijación de los bordes de la incisión quirúrgica con un separador de piel, se marcaron, por medio de los micromanipuladores, las coordenadas estereotáxicas que



A través de las sondas implantadas (Fig.7) se perfundió una disolución de KRB estándar o modificada (rica en cloruro potásico (75 mM KCl)), para provocar la despolarización del tejido y así inducir liberación de los neurotransmisores. El flujo utilizado fue de $2\mu\text{l}/\text{min}$ con la ayuda de bombas de jeringa (Bioanalytical Systems, West Lafayette, ID, U.S.A.). Cada sonda de microdiálisis se utilizó en tres experimentos.

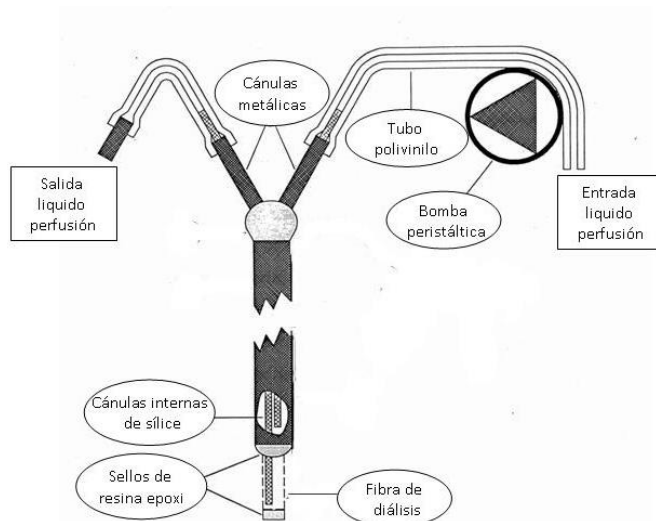


Figura 7.- Esquema del dispositivo de diálisis cerebral (dialitrodo).

El protocolo experimental fue el siguiente: Una vez implantadas las sondas se inició la perfusión con KRB. Los primeros 90 minutos se consideraron como periodo de equilibrado y no se recogieron los perfundidos. A partir de ese momento se tomaron muestras de 10 min. Los siguientes 60 minutos constituyeron el periodo control, una vez finalizado éste se cambió el medio de perfusión a KRB modificado que se mantuvo durante 30 minutos. A continuación se volvió a cambiar el medio de perfusión a KRB (periodo de lavado) y se mantuvo durante 90 minutos adicionales. Los perfundidos se guardaron a -20°C hasta el análisis de aminoácidos. Una vez finalizado el experimento, con el fin de comprobar la colocación de las sondas, el animal se perfundió intracardiamente y se extrajo el cerebro para su posterior procesamiento histológico.

11.4 Método de determinación de aminoácidos neurotransmisores por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

El contenido de aminoácidos en los perfundidos de microdiálisis se evaluaron con HPLC, con el método de derivatización precolumna con o-phthaldialdehyde (OPA) y detección fluorimétrica (Jones *y cols.*, 1981). De forma breve, el método consistió en la reacción de los aminoácidos con OPA en presencia de un mercaptano en un medio alcalino (32 mg de o-phthaldialdehyde + 800 µl de metanol + 7140 µl de tampón borato sódico 0.4 molar pH 9,5 + 60 µl de 3-mercaptopropiónico). Dicha reacción se mantiene durante un minuto tras el cual se añade ácido acético glacial al 5% para detenerla.

La fase móvil estuvo constituida por dos mezclas: fase **A** compuesta por tampón acetato sódico pH 5,88, previamente filtrado y metanol 90:10, seguido de sonicación y fase **B** compuesta por metanol y agua destilada milliQ, 70:30, seguido de sonicación.

La columna utilizada es del tipo Luna de tamaño de partículas 3 µm C18 Phenomenex 150 X 4,6 mm. y se mantuvo termostatzada a una temperatura de 32.5 °C.

El sistema suministró una elución en gradiente comenzando con %B 10 y %A 90:

En el minuto 0, %B 15 y %A 85

En el minuto 5, %B 48 y %A 52 con una duración de 8 minutos

En el minuto 13, %B 50 y %A 50 con una duración de 2 minutos

En el minuto 15, %B 80 y %A 20 con una duración de 9 minutos

En el minuto 24, %B 80 y %A 20

En el minuto 25, %B 80 y %A 20

En el minuto 27, %B 100 y %A 0

En el minuto 29, %B 100 y %A 0

En el minuto 30 vuelve a las condiciones iniciales %B 10 y %A 90.

EL flujo se mantiene durante todo el análisis a 0,5ml/minuto.

La detección se llevó a cabo con un Fluorímetro FP-2020 de Jasco. Fijando la longitud de onda de excitación a 240 nm y la de emisión a 450 nm. La concentración de cada aminoácido se calculó contra un patrón calibrado externo.

12. ESTUDIO DEL MUSCULO CARDIACO EN LOS RATONES YG8R.

Los estudios de funcionalidad e inmunohistoquímica de los corazones realizados en los ratones YG8R fueron llevados a cabo con la colaboración de la Dra. María del Carmen González y el Dr. Javier Regadera, de los Departamentos de Fisiología y de Anatomía e Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la UAM. El tejido muscular cardiaco ventricular fue fijado en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino 0,1 M (PBS) y procesado para su inclusión en parafina. Se realizaron secciones coronales de 5 μ m de grosor, que se tiñeron con hematoxilina-eosina, tinción tricrómica de Masson y tinción del ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS). Para cuantificar el tamaño del músculo cardiaco del ventrículo izquierdo, se utilizó la primera sección coronal subvalvular de cada corazón, teñida con tricrómico de Masson, y una escala milimétrica (KODAK RFS 3570 Escáner de película, Flubacher + Co. F + C). Los datos se expresaron como superficie de músculo cardiaco ventricular por milímetro (mm) de capa epicárdica, ya que las secciones valoradas de los distintos corazones no estaban exactamente al mismo nivel y sus cavidades ventriculares tenían distinto tamaño. El tamaño de los cardiomiocitos de cada ventrículo izquierdo fue medido en tres campos fotográficos visualizados a gran aumento (objetivo 40x). Se midió el diámetro menor de los cardiomiocitos rechazándose los perfiles celulares que tenían un diámetro inferior a 16 micras por considerarlos ramificaciones de las células musculares, y los que tenían diámetros superiores a 36 micrómetros, por no tener bien delimitados los bordes de los cardiomiocitos.

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

Los resultados fueron expresados como la media \pm EEM (error estándar de la media) de (n) animales independientes. Los análisis estadísticos se realizaron con los tests de, ANOVA de una vía seguido del test para comparaciones múltiples de Newman-Keuls y ANOVA de dos vías seguido del test de Newman-Keuls, considerándose las diferencias significativas para $p \leq 0,05$. Para llevar a cabo el análisis de los datos y la obtención de gráficos, se utilizó el programa Prism 5 (GraphPad software, California, EEUU).

Resultados

1- PUESTA A PUNTO Y CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE ATAXIA CEREBELOSA INDUCIDO POR 3-AP.

1.1- Efecto de la inyección intraperitoneal (i.p.) de 3-AP sobre la conducta motora y el número de neuronas de la oliva inferior.

Para la evaluación de la conducta motora, los animales sanos, necesitaron un periodo de habituación de varias sesiones hasta lograr mantenerse entre 30-60 segundos sobre la barra motorizada durante el test de aceleración. Aproximadamente un 17 % de los animales no respondieron a la prueba de coordinación motora por lo que fueron eliminados del estudio. Al lesionar los animales seleccionados con 40 mg/kg de 3-acetilpiridina (3-AP), la mayoría de ellos, sufrió un empeoramiento progresivo en la coordinación motora, manifestándose una reducción significativa en el tiempo de permanencia en aceleración a partir de los quince días post-lesión (Fig.1), aunque entre el tercer y el octavo día ya eran visibles los signos de ataxia.

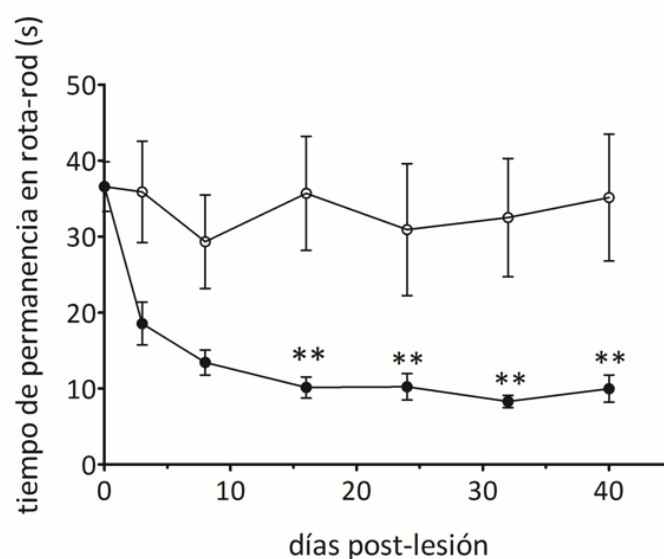


Figura 1.- Efecto de la lesión con 40 mg/kg de 3-AP sobre la coordinación motora. En el eje de ordenadas se muestra el tiempo de permanencia en aceleración (medido en segundos) de las ratas sanas (círculos blancos) y de las ratas lesionadas con 40 mg/kg de 3-AP (círculos negros) en el rota-rod. Nótese como la coordinación motora disminuye progresivamente en los animales lesionados con la neurotoxina. Los resultados representan la media \pm EEM de 11 animales independientes. ** $p \leq 0,01$ vs rata sana.

El Fluorojade B es un reactivo que permite detectar neuronas en degeneración y glía reactiva (Schmued y Hopkins, 2000; Anderson y cols., 2003; Damjanac y cols., 2007). La inyección i.p. de 40 mg/kg de la neurotoxina 3-AP, provocó muerte celular en el tronco del

encéfalo (Fig. 2). A los 3 días post-lesión la mayoría del marcaje positivo para FluoroJade B se observó en las neuronas de la oliva inferior (Fig. 2A), mientras que a los 8 días post-lesión el marcaje positivo para FluoroJade B se observó en las neuronas dañadas y en las células gliales (Fig. 2 D). A los 24 días post-lesión prácticamente no se detectaron neuronas dañadas, asociándose el marcaje para FluoroJade B con células gliales (Fig. 2 E).

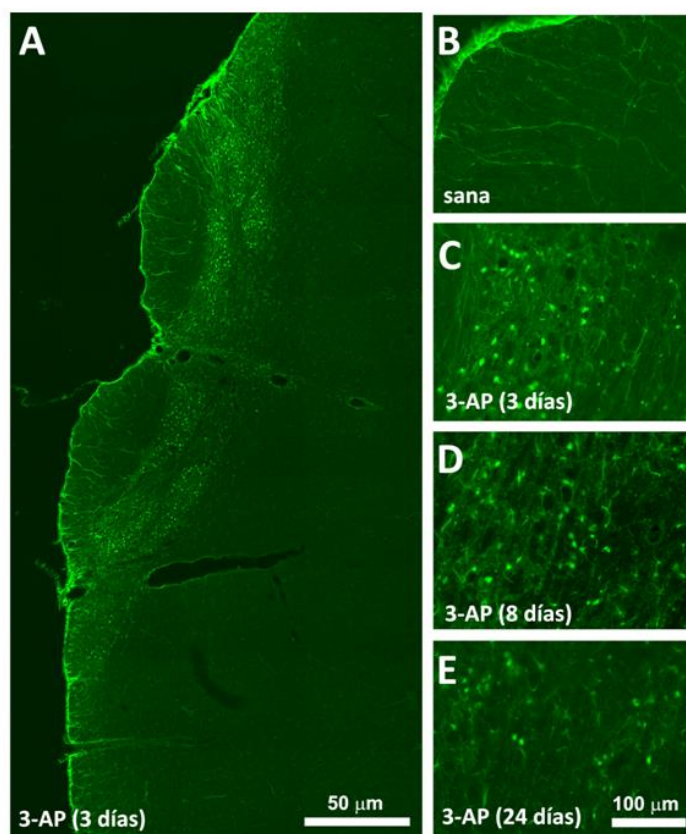


Figura 2.- Tinción para FluoroJade B en el tronco del encéfalo de las ratas lesionadas con 3-AP. Se muestra la detección de las neuronas degeneradas marcadas con FluoroJade B (verde), en distintos cortes transversales del tronco del encéfalo correspondientes con la zona 2 de la oliva inferior de la rata sana (B) y lesionada con 3-AP a los 3 días post-lesión (A y C), a los 8 días post-lesión (D) y a los 24 días post-lesión (E). Barra de escala: A (50µm); B-E (100 µm).

La calbindina es una proteína capaz de unirse al ión calcio con alta afinidad, se expresa en las neuronas de la oliva inferior y en las células de Purkinje (CP) del cerebelo (Schwaller y cols., 2002). En las ratas sanas, las neuronas de la oliva inferior expresaron calbindina, observándose una distribución distinta de dichas neuronas dependiendo del nivel de la oliva analizado (Fig. 3, A-B y Fig. 5 de la sección de métodos). A los 40 días post-lesión con 3-AP, los animales que mostraron un empeoramiento motor progresivo, presentaron una

disminución significativa en el número de células calbindina-positivas en los distintos niveles de la oliva inferior analizados (Fig. 3 C-D y E).

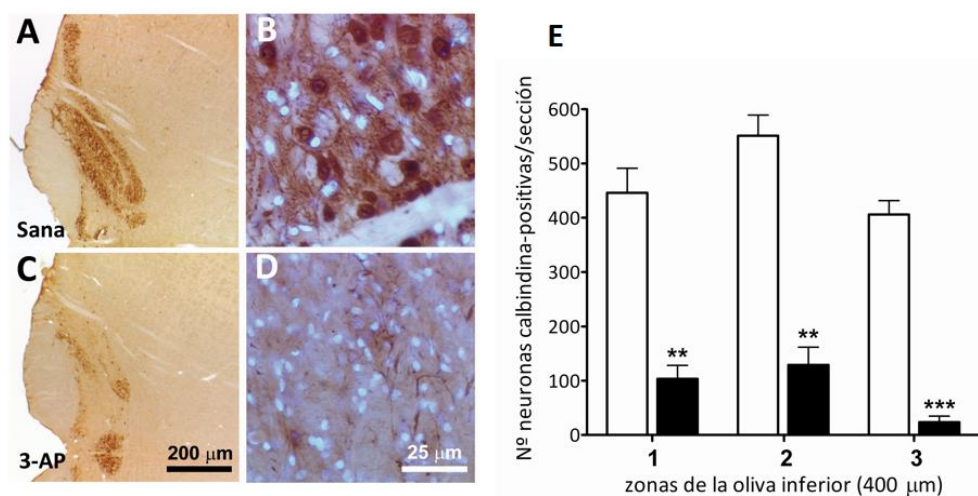


Figura 3.- Efecto de la lesión con 3-AP en la expresión de calbindina en la oliva inferior. En A-D se muestra la inmunodetección de calbindina (marrón) en la oliva inferior de las ratas sanas (A, B) y de ratas lesionadas con 40 mg/kg 3-AP (C, D). En B y D se muestran los núcleos celulares marcados con Hoechst (azul). En E se muestra el número de neuronas calbindina-positivas remanentes en distintos niveles de la oliva inferior tras la lesión producida por la neurotoxina (barras negras), en comparación con las ratas sanas (barras blancas). Los resultados en E representan la media \pm EEM de 4 a 12 animales independientes. ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ vs rata sana.

Con el objeto de determinar la dosis más efectiva de la neurotoxina a utilizar en nuestra investigación, un grupo de ratas sanas fueron inyectadas con 15, 25, y 60 mg/kg de 3-AP. Tal y como se muestra en la Fig. 4 A, los animales que recibieron dosis de 15 y 25 mg/kg de 3-AP mostraron una disminución en la coordinación motora a los 3 y 8 días tras la inyección de la neurotoxina. Sin embargo, en los distintos niveles de la oliva inferior analizados en estos animales no se apreció ningún cambio en el número de neuronas calbindina-positivas cuando se compararon con el grupo de ratas sanas (Fig. 4 B). Por otro lado, a los animales lesionados con 60 mg/kg de 3-AP hubo que sacrificarlos a las 24 horas post-lesión, ya que presentaban signos de cianosis y una ataxia severa, siendo incapaces de mantenerse en pie. El estudio inmunohistoquímico para calbindina de la oliva de éstos animales confirmó la muerte neuronal en la mayor parte de esta estructura (Fig. 4B).

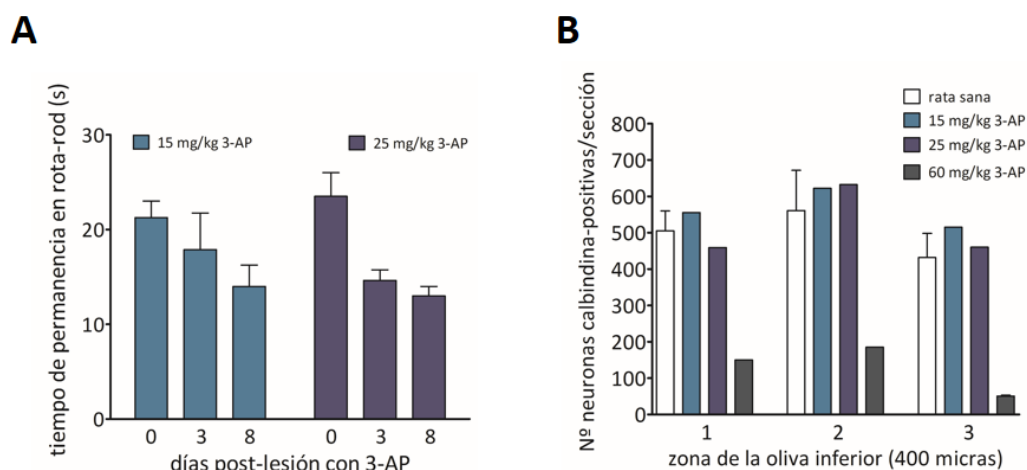


Figura 4.- Efectos del tratamiento con distintas dosis de 3-AP sobre la coordinación motora y las neuronas calbindina-positivas de la oliva inferior. En A se muestra la conducta motora de los animales tratados con 15 y 25 mg/kg de 3-AP. Se observa una reducción en el tiempo de permanencia en aceleración (medido en segundos) a los 8 días de tratamiento con ambas dosis de la neurotoxina. En B se representa el número de neuronas calbindina-positivas en los 3 niveles de la oliva inferior analizados a los 15 días post-lesión. Nótese como en los animales tratados con 60 mg/kg de 3-AP durante 24 h el número de neuronas calbindina-positivas disminuye en comparación con la rata sana, y con los animales tratados durante 8 días con 15 y 25 mg/kg de 3-AP. En A, los resultados representan la media \pm EEM de 3 animales independientes. En B, los resultados representan la media \pm EEM de 3 animales independientes (rata sana), o de un animal representativo tratado con las distintas dosis de 3-AP.

1.2- Efecto de la inyección i.p. de 40 mg/kg de 3-AP sobre la proliferación de la microglía en la oliva inferior.

Para determinar si el daño neuronal causado por la neurotoxina 3-AP en la oliva inferior promueve la proliferación de los progenitores neurales, y/o la generación de nuevas neuronas (neurogénesis), una serie de animales lesionados con 40 mg/kg de 3-AP de 3 y 8 días de evolución recibieron una inyección i.p. diaria de 50 mg/kg de BrdU durante 15 días. Al término de las inyecciones de BrdU, los animales se sacrificaron y la proliferación celular se estudió mediante técnicas de inmunohistoquímica. Tal y como se muestra en la Fig. 5A, la oliva inferior de los animales en los que el tratamiento con BrdU se inició al tercer día post-lesión, mostró la presencia de un gran número de células BrdU-positivas (Fig. 5 G). El índice de proliferación fue directamente proporcional al grado de lesión de la oliva, es decir, al número de células calbindina-positivas remanentes en la oliva, considerando lesión de grado medio a las olivas con 330 ± 3 neuronas (grupo 3-AP 1) y lesión de grado alto a las que tuvieron 83 ± 10 neuronas (grupo 3-AP 2) (Fig. 5 H).

Por otro lado, las olivas de aquellos animales en los que se inició el tratamiento con BrdU al octavo día post-lesión no mostraron prácticamente células BrdU-positivas, sugiriendo que la mayor parte de la respuesta proliferativa está asociada a los primeros estadios del daño neuronal producido por la neurotoxina.

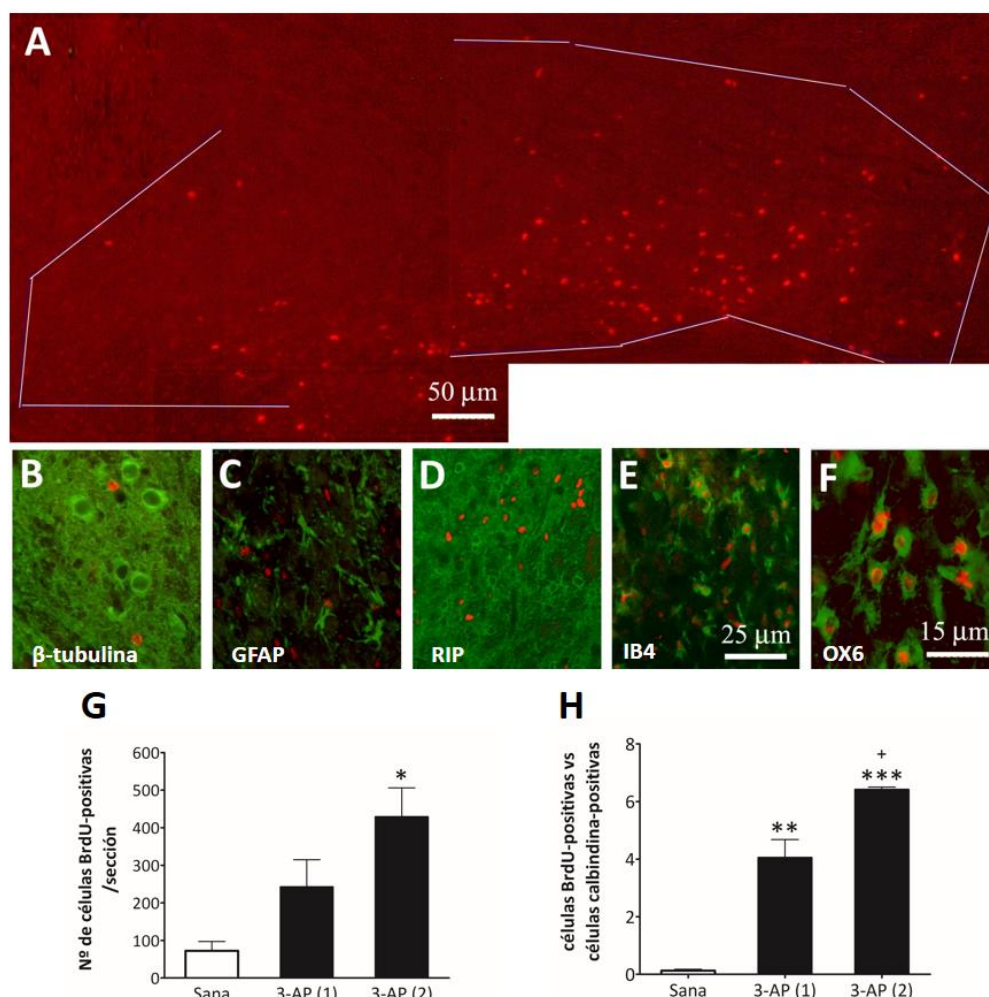


Figura 5.- Efecto de la lesión con 3-AP sobre la proliferación celular. En A se muestra la inmunotinción para BrdU (rojo) en la oliva inferior de una rata tratada con 40 mg/kg de 3-AP. En B-F se muestran dobles inmunomarcajes para β -tubulina III (B, verde), GFAP (C, verde), RIP (D, verde), OX6 (E, verde), e IB4 (F, verde) con los marcadores de proliferación celular BrdU (B, C y F, rojo), y PCNA (D y E, rojo). Nótese el comarcaje de los marcadores de microglía OX6 (E, verde) e IB4 (F, verde) con los marcadores de proliferación PCNA (E, rojo) y BrdU (F, rojo) en la oliva inferior de la rata lesionada con 40 mg/kg de 3-AP. Barra de escala: A (50 μ m), B-E (25 μ m) y F (15 μ m). En G y H se muestra el número de células BrdU-positivas (G) y de neuronas calbindina-positivas (H) en la oliva inferior de la rata sana (barras blancas) y de ratas lesionadas con 3-AP con pérdida neuronal media (3-AP 1) y pérdida neuronal alta (3-AP 2) (barras negras). Nótese como el aumento en células positivas para BrdU se correlaciona con una mayor pérdida en el número de células positivas para calbindina (H). Los resultados en G y H representan la media \pm EEM de 3-4 animales independientes. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ vs rata sana.

Para determinar el fenotipo de las células proliferantes realizamos una doble-inmunotinción con los marcadores de proliferación BrdU ó PCNA, y con marcadores específicos de neuronas (β -tubulina III y doblecortina), astrocitos (GFAP), y

oligodendrocitos (RIP). Tal y como se muestra en la Fig. 5 B, C y D, no se observaron dobles marcajes entre las células en proliferación, y los distintos marcadores neurales analizados. Tampoco se detectaron células doblecortina-positivas en las olivas de los animales tratados con 3-AP, indicando la ausencia de neuroblastos en migración.

La proliferación de la microglía se ha asociado con la patogénesis de algunas enfermedades neurodegenerativas. Tras la lesión con 3-AP, la mayoría de las células en proliferación de la oliva inferior expresaron los marcadores de microglía IB4 (Fig.5 E) y de microglía activada OX6 (Fig.5 F).

1.3- Efecto de la inyección i.p. de 40 mg/kg de 3-AP sobre marcadores de la función cerebelosa.

Como hemos visto, la inyección i.p. de 40 mg/kg de 3-AP provocó una muerte neuronal selectiva en la oliva inferior. La oliva inferior tiene una gran importancia en el funcionamiento del cerebelo, ya que es el origen de las fibras trepadoras que envían señales glutamatérgicas excitatorias a las CP. Al igual que las neuronas de la oliva inferior, las CP del cerebelo también expresan calbindina. Mediante técnicas de inmunohistoquímica comprobamos que en la corteza cerebelosa de la rata sana la inmunotinción para calbindina se observaba en el soma de las CP, en sus arborizaciones dendríticas de la capa molecular y en los axones que discurren por la capa granular y la médula (Fig. 6, A-B). Al igual que en la rata sana, la corteza cerebelosa de las ratas lesionadas con 3-AP también mostró inmunotinción positiva para calbindina en las CP, sin que aparentemente se observaran cambios significativos en la distribución de esta proteína en comparación con la rata sana (Fig. 6, C-D). Sin embargo, la lesión con la neurotoxina disminuyó significativamente la expresión de la proteína calbindina en el cerebelo (Fig.6 E).

Las CP proyectan sobre las neuronas de los núcleos profundos del cerebelo ejerciendo sobre ellos una acción inhibitoria mediante sinapsis gabaérgicas. La inmunotinción para calbindina mostró que en las ratas sanas, las neuronas de los núcleos profundos estaban rodeadas por una gran densidad de terminales sinápticos calbindina-positivos procedentes de los axones de las CP (Fig.11 D). Tal y como se observa en la Fig.6, la lesión con 3-AP disminuyó significativamente el número de neuronas asociadas a los terminales

calbindina-positivos en los núcleos fastigial (Fig.6 F) e interpuesto (Fig.6 G) del cerebelo, sin que se observaran cambios significativos en el núcleo dentado.

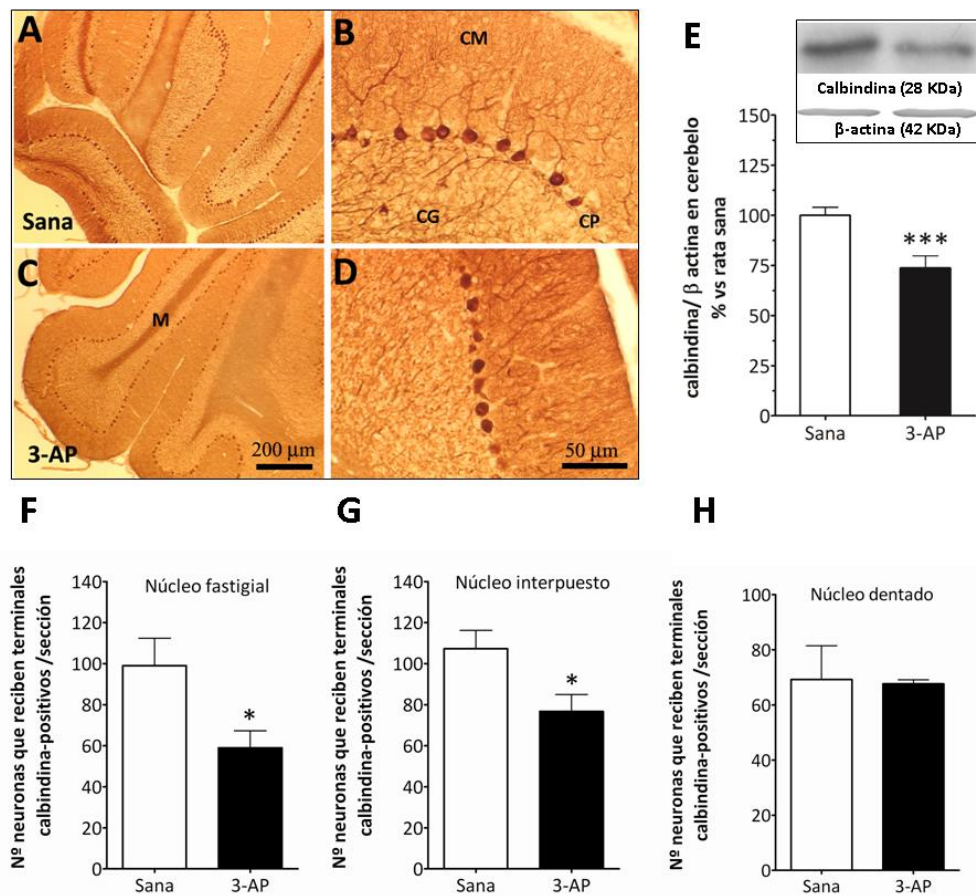


Figura 6.- Efecto de la lesión con 3-AP sobre la expresión de calbindina en el cerebelo. En A-D se muestra la inmunodetección de calbindina (marrón) en cortes coronales del cerebelo de la rata sana (A-B), y de la rata lesionada con 40 mg/kg de 3-AP (C-D). Nótese como la localización de la calbindina en los somas de las células de Purkinje (CP), en los árboles dendríticos de la capa molecular (CM), y en los axones que atraviesan la capa granular (CG) y la médula (M) es similar en ambos grupos experimentales. Barra de escala 200 μ m en A y C, y 50 μ m B y D. En E, se muestran los resultados de western blot para la expresión de calbindina en el cerebelo de la rata sana (barra blanca), y en el cerebelo de ratas lesionadas con 3-AP (barra negra). En F-H se muestra el número de neuronas asociadas a terminales calbindina-positivos en los núcleos profundos del cerebelo donde proyectan las CP. Los resultados representan la media \pm EEM de 4 (F-H) y de 16 a 23 (E) animales independientes. * $p \leq 0,05$ *** $p \leq 0,001$ vs rata sana.

Otro marcador expresado por las CP del cerebelo es el receptor 1 del Glutamato (GLUR1). El marcaje para GLUR1 se observó en los axones de las CP y sus arborizaciones dendríticas tanto en la rata sana (Fig. 7, A-B), como en la rata lesionada con 3-AP (Fig. 7, C-D). Al igual que sucedía con la calbindina, no se observaron diferencias en la distribución de esta proteína entre ambos grupos experimentales, pero sí se encontró una disminución en la expresión de GLUR1 en el cerebelo del grupo lesionado con 40 mg/Kg de 3-AP (Fig.7 E) con respecto al grupo de ratas sanas.

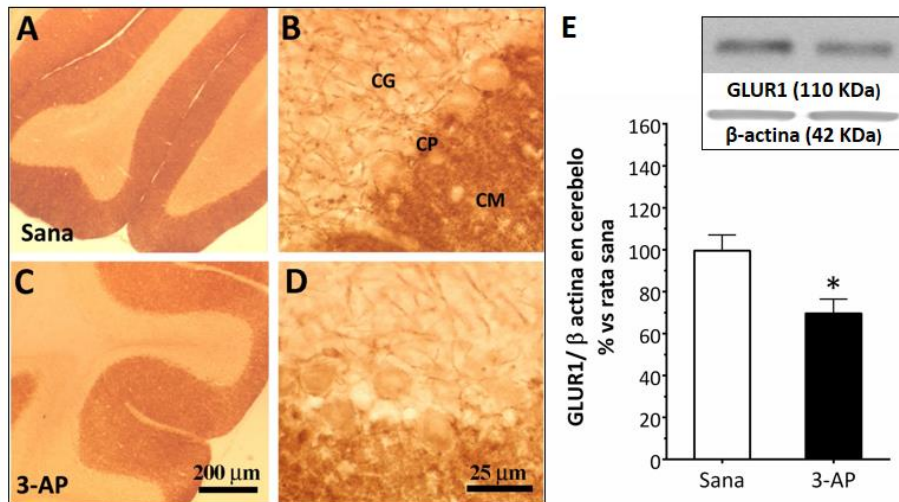


Figura 7.- Efecto de la neurotoxina 3-AP sobre la expresión de GLUR1 en el cerebelo. En A-D se muestra la inmunodetección de GLUR1 (marrón) en cortes coronales del cerebelo de la rata sana (A-B), y de la rata lesionada con 40 mg/kg de 3-AP (C-D). La lesión con 3-AP no modifica la localización de GluR1. CM: capa molecular, CG: capa granular, CP: células de Purkinje. Barra de escala 200 μm en A y C, y 25 μm B y D. En E, se muestra el inmunoblot para GluR1 en el cerebelo de la rata sana (barra blanca), y en el cerebelo de ratas lesionadas con 3-AP (barra negra). Los resultados en E representan la media ± EEM de 12 a 13 animales independientes. * $p \leq 0,05$ vs rata sana.

2-. ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE LGF EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE ATAXIA CEREBELOSA INDUCIDO POR 3-AP.

2.1- El tratamiento con LGF estabiliza el comportamiento motor en ratas con lesión de la oliva inferior promovida por 3-AP.

Resultados previos han puesto de manifiesto el papel neurotrófico y/o neurogénico del LGF en el Parkinson experimental (Bazán y cols., 2005; Reimers y cols., 2006; Gonzalo-Gobernado y cols., 2009; Reimers y cols., 2012; Gonzalo-Gobernado y cols., 2013). Para evaluar el potencial terapéutico del LGF en la ataxia cerebelosa, un grupo de ratas lesionadas con 40 mg/kg de 3-AP recibieron a los 8 días post-lesión 6 inyecciones i.p. de vehículo (salino) (grupo 3-AP), o de LGF (5µg/rata) (grupo 3-AP+LGF) a lo largo de 3 semanas. Tal y como se muestra en la Fig. 8, el tiempo de permanencia en aceleración de los animales lesionados que recibieron vehículo (3-AP), disminuyó durante el periodo de tratamiento, hasta alcanzar un plató a los 24 días post-lesión que se mantuvo a lo largo del tiempo de experimentación analizado en este estudio (75 días).

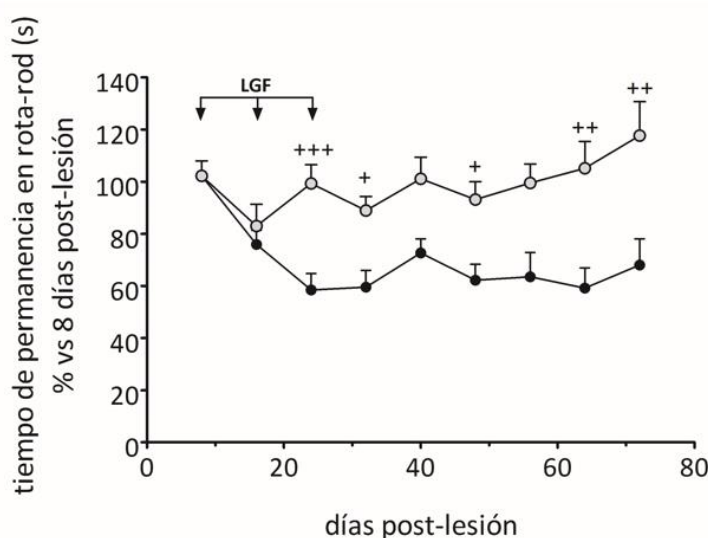


Figura 8.- Efecto del LGF sobre la coordinación motora en los animales lesionados con 3-AP. El tratamiento con LGF (5µg/rata) a lo largo de 3 semanas (círculos grises) (3-AP+LGF) promueve una mejora significativa en la coordinación motora de los animales lesionados con 3-AP (40 mg/kg) en comparación con las ratas atáxicas que recibieron vehículo (círculos negros) (3-AP). Los resultados representan la media \pm EEM de 17 a 24 animales independientes. $+\leq 0,05$ $++\leq 0,01$ $+++\leq 0,001$ vs 8 días post-lesión con 3-AP.

Sin embargo, en los animales tratados con LGF la conducta motora tendió a estabilizarse, de manera que a la tercera semana de tratamiento, el tiempo de permanencia en aceleración fue similar al observado al inicio del tratamiento con el factor y

significativamente superior al observado en los animales que recibieron vehículo durante todo el periodo de estudio (Fig.8).

2.2- El factor de crecimiento de hígado promueve la supervivencia celular en el tronco del encéfalo.

Trabajos previos de nuestro laboratorio indican que en el Parkinson experimental el LGF estimula la expresión de proteínas implicadas en la supervivencia celular como Bcl2 (Reimers y cols., 2012; Gonzalo-Gobernado y cols., 2013). El tronco del encéfalo es el área principalmente afectada por la lesión con 3-AP, por lo que mediante técnicas de western blot analizamos los efectos del LGF sobre los niveles de Bcl2 y de la proteína proapoptótica Bax en dicha estructura (Gross y cols., 1999; Frebel y Wiese, 2006; Lee y cols., 2009). Tal y como se observa en la Fig.9 A, la administración intraperitoneal de LGF incrementó significativamente la relación Bcl2/Bax en comparación con los animales sanos, y con las ratas atáxicas que recibieron vehículo. Además, el LGF también incrementó los niveles del marcador de neuronas maduras NeuN (Fig.9 B). Estos resultados sugieren el posible papel neuroprotector del LGF en tronco del encéfalo de las ratas 3-AP, que podría ser directo sobre las neuronas calbindina-positivas de la oliva inferior. Sin embargo, tanto los animales 3-AP que recibieron vehículo, como aquellos tratados con LGF, mostraron una reducción importante en el número de neuronas calbindina-positivas en comparación con la rata sana, no observándose diferencias en este parámetro cuando se compararon entre sí las olivas de ambos grupos experimentales (Fig.9 C). Resultados similares se obtuvieron cuando se analizó la expresión de calbindina en el tronco del encéfalo mediante técnicas de western blot (Fig.9 D).

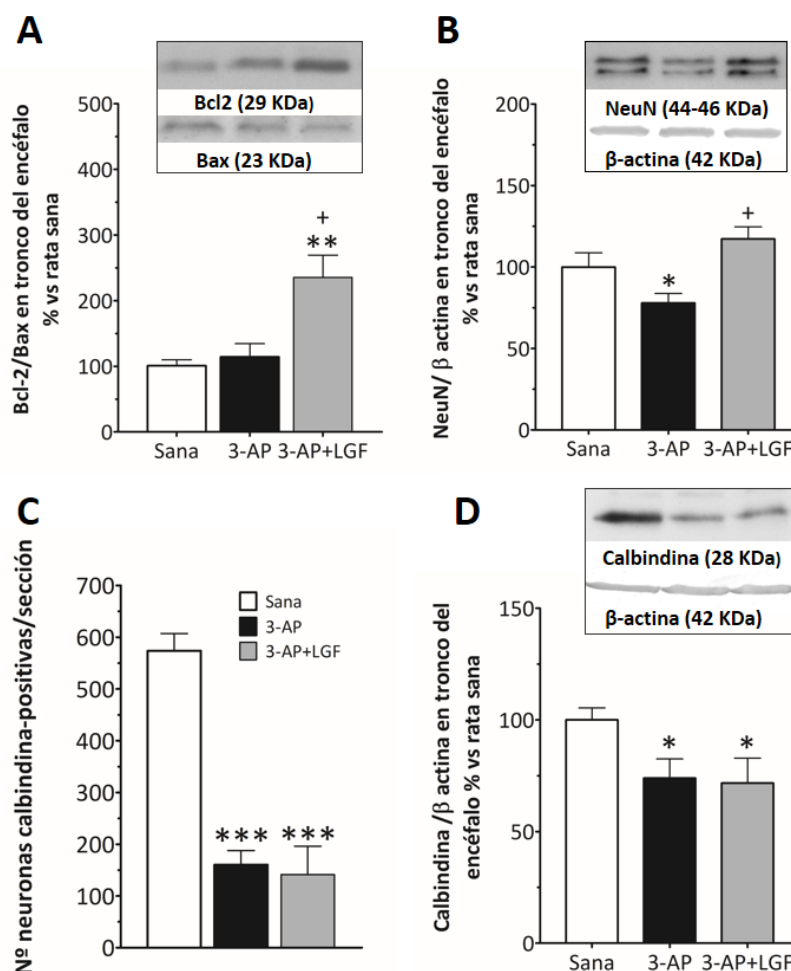


Figura 9.- Efecto del tratamiento con LGF en la expresión de marcadores neuronales y proteínas involucradas en supervivencia celular. El tratamiento con LGF (5µg/rata) incrementa significativamente la relación Bcl2/Bax (A) y la expresión de NeuN (B) en el tronco del encéfalo de ratas lesionadas con 3-AP (40 mg/kg). En C y D se muestra como el tratamiento con LGF no restaura la pérdida de neuronas calbindina-positivas en la oliva inferior (C), ni la disminución en la expresión de calbindina en el tronco del encéfalo (D) provocada por la neurotoxina. Los resultados en A-B y D representan la media ± EEM de 6 a 18 y en C de 5-7 animales independientes. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ vs rata sana. + $p \leq 0,05$ vs ratas lesionadas con 3-AP que recibieron vehículo.

Es posible que para que el LGF pueda ejercer un papel neuroprotector sobre las neuronas de la oliva inferior tenga que ser administrado en estadios más tempranos de lesión. Así, un grupo de ratas tratadas con 40 mg/kg de 3-AP de tres días de evolución recibió, durante 3 semanas, 6 inyecciones i.p. de suero salino o de LGF (5µg/rata/inyección). Al término del tratamiento los animales fueron sacrificados y sus olivas analizadas por inmunohistoquímica. Tanto en el grupo 3-AP que recibió vehículo, como el tratado con LGF se observó una reducción progresiva de la conducta motora (Fig.10 A). Además, ambos tratamientos disminuyeron significativamente el número de neuronas calbindina-positivas de la oliva inferior (Fig.10 B).

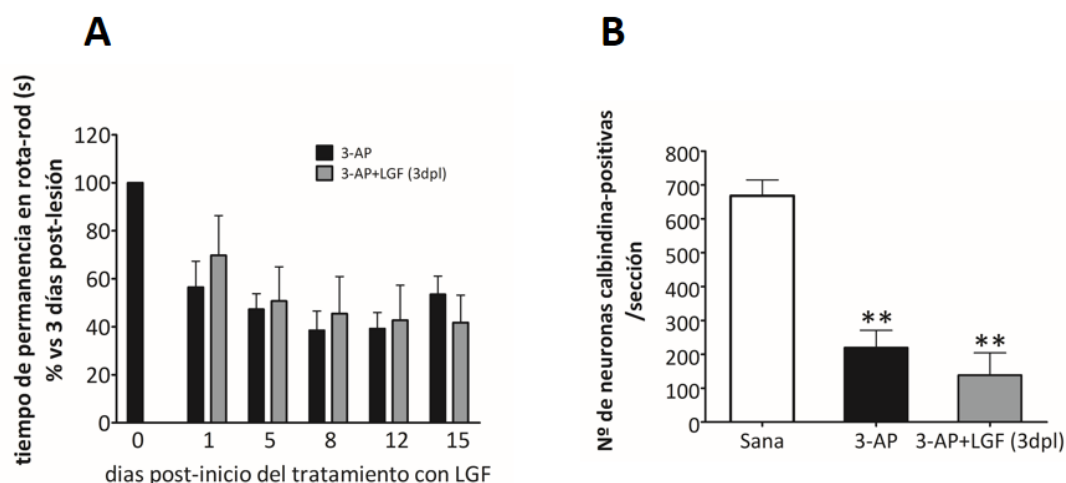


Figura 10.- Efectos del tratamiento con LGF a los 3 días post-lesión con 3-AP sobre la coordinación motora y el número de neuronas calbindina-positivas en la oliva inferior. En A se muestra la evolución de la coordinación motora de los animales lesionados con 40 mg/kg de 3-AP de 3 días de evolución tratados con salino (barras negras), o 5 µg/rata de LGF (barras grises). En B se muestra el número de neuronas calbindina-positivas en la oliva inferior de los animales atáxicos tratados con salino y LGF, y de la rata sana (barra blanca). Nótese como el tratamiento con LGF no mejora la coordinación motora (A), ni previene la pérdida de neuronas calbindina-positivas en la oliva inferior (B) promovidas por la lesión con 3-AP. En A los resultados representan la media \pm EEM de 5 animales independientes. En B los resultados representan la media \pm EEM de 3 a 4 animales independientes. ** $p \leq 0,01$ vs rata sana.

2.3- La administración intraperitoneal de LGF previene la disminución en calbindina y el incremento de OX6 en el cerebelo provocado por 3-AP.

Como hemos mostrado anteriormente, la lesión con 3-AP reduce significativamente el número de terminaciones sinápticas calbindina-positivas que rodean las neuronas de los núcleos profundos del cerebelo, y la expresión de calbindina en dicha estructura. Cuando analizamos la expresión de calbindina en el cerebelo, comprobamos que en los animales tratados con LGF, los niveles de calbindina eran similares a los de los animales sanos y significativamente superiores a los encontrados en los cerebelos de las ratas lesionadas con 3-AP (Fig.11G). Además, la administración de LGF también previno la disminución en el número de neuronas rodeadas de terminales sinápticos calbindina-positivos observado en los núcleos fastigial e interpuesto de los animales lesionados con 3-AP (Fig.11 H). Estos resultados sugieren un posible papel neuroprotector del LGF en el cerebelo de las ratas atáxicas, que podría explicar la estabilización de la coordinación motora observada en los animales lesionados con 3-AP que recibieron LGF.

A diferencia de lo observado para la expresión de calbindina, el tratamiento con LGF no revirtió la disminución en los niveles de GLUR1 promovida por la neurotoxina en el cerebelo.

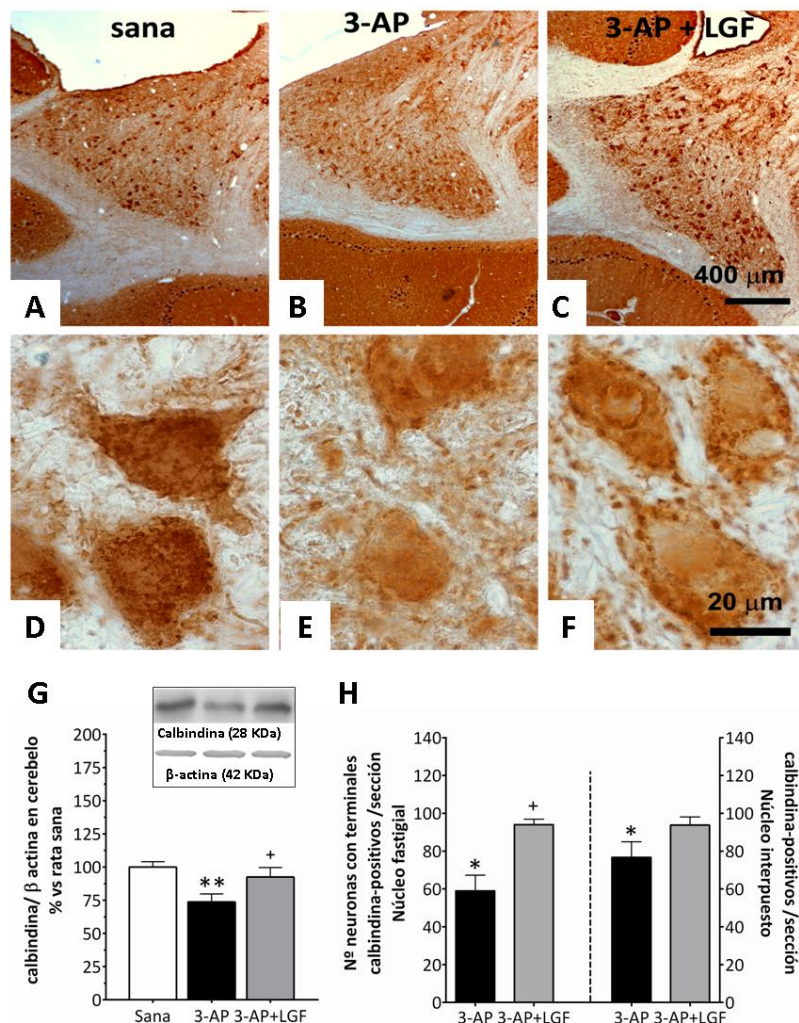


Figura 11.- Efectos del tratamiento con LGF sobre la expresión de calbindina en el cerebelo de ratas lesionadas con 3-AP. En A-F se muestra la inmunotinción para calbindina (marrón) en cortes coronales del núcleo fastigial de la rata sana (A y D), y de ratas lesionadas con 40 mg/kg 3-AP tratadas con vehículo (B y E) o con 5µg/rata LGF (C y F). En H se muestra el número de neuronas rodeadas de terminales calbindina-positivas en los núcleos fastigial e interpuesto de ratas lesionadas con 3-AP tratadas con vehículo (barras negras) o LGF (barras grises). Nótese como el LGF incrementa la inmunotinción para calbindina en el núcleo fastigial (E y F) y el número de terminales sinápticos calbindina-positivos sobre las neuronas de los núcleos fastigial e interpuesto (H), en comparación con los animales que recibieron vehículo. Barra de escala: 400 µm (A-C) y 20 µm (D-F). En G se muestran los resultados de inmunoblot para la expresión de calbindina en el cerebelo de las ratas sanas (barra blanca) y de las ratas lesionadas con 3-AP que recibieron vehículo (barra negra), o que recibieron LGF (barra gris). Los resultados representan la media ± EEM de 4 (H), y de 14 a 23 (G) animales independientes. *p≤0,05 ** p≤0,01 vs rata sana. +p≤0,05 vs ratas lesionadas con 3-AP que recibieron vehículo.

En el tronco del encéfalo, el LGF estimula la expresión de proteínas implicadas en la supervivencia celular como Bcl2. Sin embargo, en el cerebelo de las ratas lesionadas con

3-AP, tratadas o no con LGF, no se encontraron diferencias significativas en la relación Bcl2/Bax en comparación con los animales sanos (dato no mostrado).

Una de las acciones que ejerció la neurotoxina 3-AP sobre el cerebelo fue promover la reactividad glial, ya que aumentaron significativamente los niveles de GFAP en $1,24 \pm 6,1$ veces ($p \leq 0,01$ vs rata sana), y del marcador de microglía activada OX6 (Fig.12D).

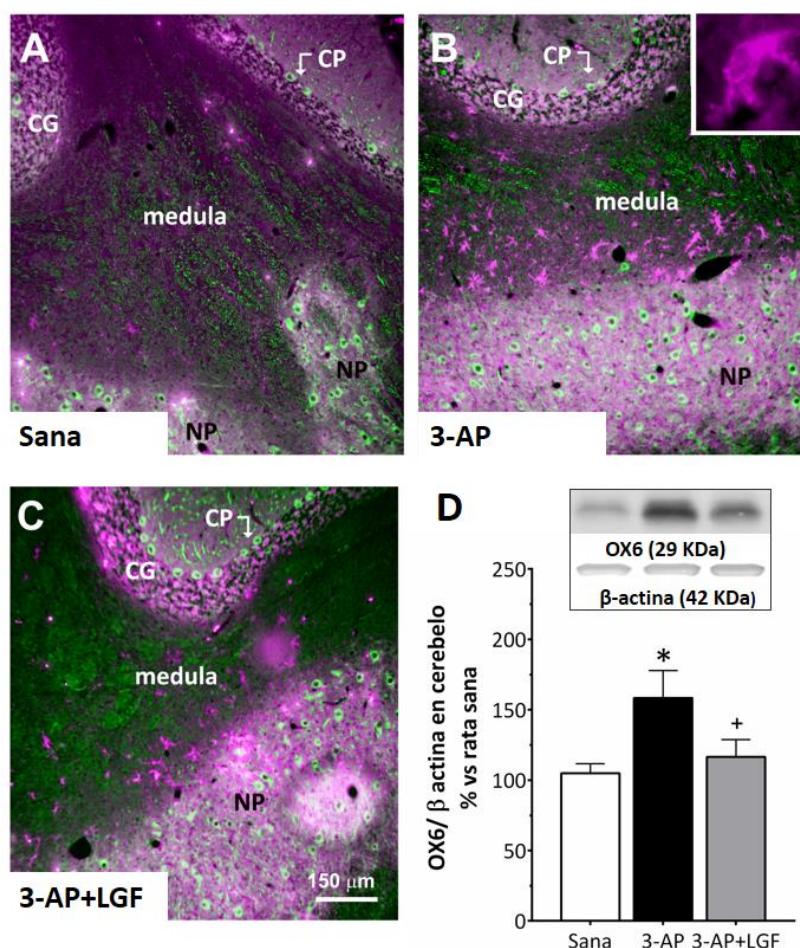


Figura 12.- Efecto del tratamiento con LGF sobre la inmunotinción y expresión de OX6 en el cerebelo de ratas con lesión de la oliva inferior inducida por 3-AP. En A-C se muestra la doble inmunotinción para β -tubulina III (verde) y el marcador de microglía activada OX6 (morado) en cortes coronales del cerebelo de la rata sana (A), la rata lesionada con 3-AP (B) y de la rata lesionada con 3-AP tratada con LGF (C). Nótese como aumenta el nº de células OX6-positivas en la médula de las ratas 3-AP que recibieron vehículo (B) en comparación con la rata sana (A) y con los animales lesionados que recibieron LGF (C). Barra de escala: 150 μ m (A-C). En D se muestran los resultados de inmunoblot para la expresión de OX6 en el cerebelo de la rata sana (barra blanca), de la rata 3-AP tratada con salino (barra negra), y de la rata 3-AP tratada con LGF (barra gris). Los resultados representan la media \pm EEM de 17 a 20 (D) animales independientes. * $p \leq 0,05$ vs rata sana. + $p \leq 0,05$ vs ratas lesionadas con 3-AP que recibieron vehículo. Abreviaturas: CG (Capa Granulosa), CP (Células de Purkinje) y NP (Núcleos Profundos).

El tratamiento con LGF no previno el aumento en GFAP inducido por la 3-AP en el cerebelo, pero si revirtió significativamente los niveles de OX6 en dicha estructura (Fig.12D). Resultados similares se obtuvieron mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Así, en los animales lesionados con 3-AP tratados con LGF pudimos observar un menor número de células OX6-positivas tanto en la médula, como en los núcleos profundos del cerebelo en comparación con los animales atáxicos que fueron tratados con vehículo (Fig.12C).

2.4- El tratamiento con LGF modula la concentración extracelular de Glutamato y GABA en la corteza cerebelosa de las ratas lesionadas con 3-AP.

Glutamato (GLU) y GABA son los neurotransmisores que regulan principalmente la actividad del cerebelo y se ven afectados en los distintos tipos de ataxia. Mediante técnicas de microdiálisis analizamos el contenido extracelular de ambos neurotransmisores en la corteza cerebelosa de las ratas lesionadas con 3-AP. Tal y como se observa en la Fig. 13 B, la lesión con 3-AP incrementó significativamente la concentración basal de GLU en comparación con los animales sanos, sin que se observaran cambios significativos en la concentración basal de GABA en estos animales (Fig. 13 D). El tratamiento con LGF previno el incremento en los niveles basales de GLU, y disminuyó significativamente la concentración basal de GABA (Figs. 13 B y D), sugiriendo un aumento en la afinidad de los transportadores para GLU y GABA en la corteza cerebelosa de las ratas atáxicas tratadas con el factor. Cuando se estimuló la liberación de ambos neurotransmisores mediante un pulso de K⁺ se observó un aumento muy significativo en la liberación de GABA en las ratas lesionadas con 3-AP en comparación con la observada en los controles y en los animales que recibieron LGF (Fig.13 B). El tratamiento con el factor también disminuyó la concentración de GLU a niveles similares a los encontrados en las ratas sana (Fig. 13 A).

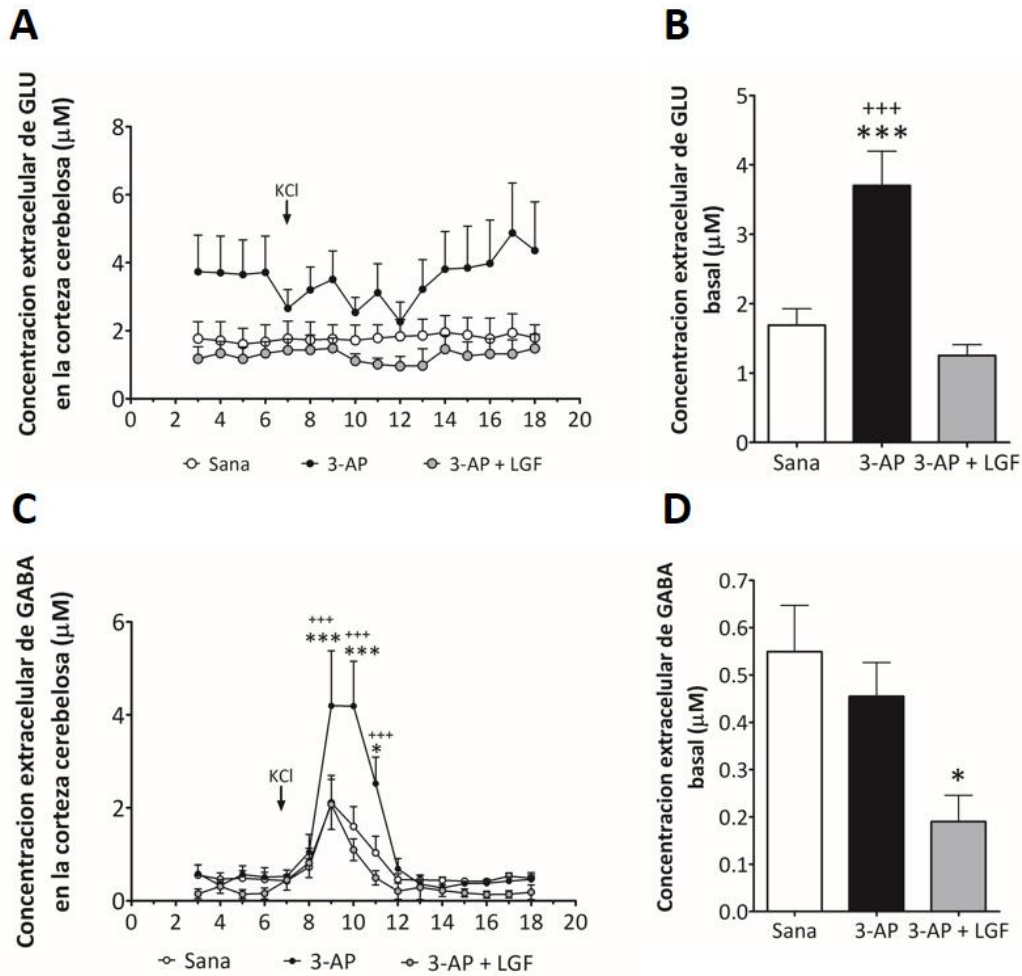


Figura 13.- Efecto del tratamiento con LGF sobre la concentración extracelular de Glutamato (GLU) y GABA en la corteza cerebelosa de las ratas lesionadas con 3-AP. En A y C se muestra la concentración extracelular de Glutamato (A) y GABA (C) en situación basal (fracciones 1-6) y tras la estimulación con 75 mM KCl (fracciones 7-9) y en el periodo de lavado (fracciones 10-18) en la corteza cerebelosa de ratas sanas (círculos abiertos) y ratas lesionadas con 3-AP tratadas con vehículo (círculos negros) o con LGF (5 μg /rata) (círculos grises). En B y D se representan las concentraciones basales medias de GLU (B) y GABA (D) en la corteza cerebelosa de la rata sana (barra blanca) y de ratas atáxicas tratadas con vehículo (barra negra) o LGF (barra gris). Nótese como el LGF disminuye los niveles basales de GLU y GABA (B, D), y previene el aumento en la liberación de GABA provocado por la neurotoxina (C). Los resultados representan la media \pm EEM de 4 a 7 animales independientes. *p<0,05 *** p<0,001 vs rata sana. +++p<0,05 vs 3-AP+LGF.

3- EFECTOS DEL LGF EN EL MODELO MURINO DE ATAXIA DE FRIEDREICH YG8R.

3.1- Efecto del tratamiento con LGF sobre la coordinación motora y el peso corporal de los ratones YG8R.

Está descrito que en los ratones YG8R se produce un empeoramiento en su coordinación motora dependiente de la edad (Al-Mahdawi y cols., 2006). Es por ello que quisimos analizar si el tratamiento con LGF podría mejorar las alteraciones en este parámetro.

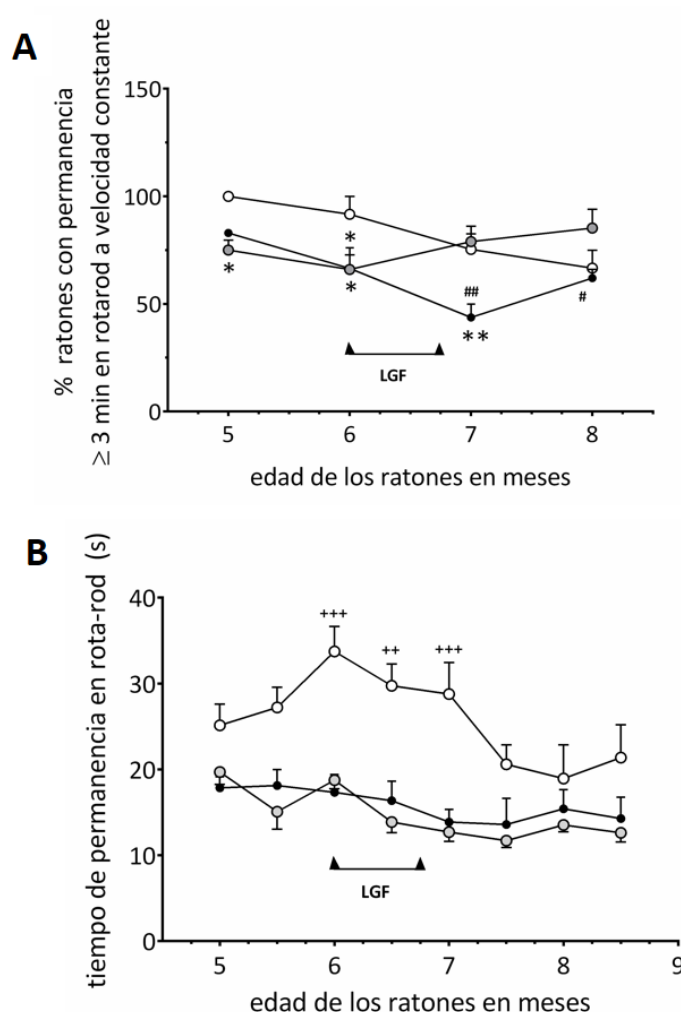


Figura 14.- Efecto del LGF sobre la coordinación motora de los ratones YG8R. En A se muestra el porcentaje de ratones que se mantuvieron en el rota-rod durante 3 o más minutos a velocidad constante en el grupo WT (círculos blancos), YG8R (círculos negros), e YG8R+LGF (círculos grises). Nótese como al final de los experimentos el porcentaje de ratones YG8R+LGF que permanecen en el rota-rod durante 3 o más minutos a velocidad constante (A) es significativamente superior al observado en el grupo YG8R. En B se muestra la coordinación motora analizada mediante el test de aceleración en rota-rod (medido en segundos) en los ratones WT (círculos blancos) y ratones YG8R tratados con vehículo (YG8R, círculos negros) o tratados con LGF (YG8R+LGF, círculos grises). Los resultados representan la media \pm EEM de 6-8 animales independientes. ++ $p < 0,01$ +++ $p < 0,001$ vs ratones YG8R. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ vs ratones WT. # $p < 0,05$ ### $p < 0,01$ vs ratones YG8R+LGF.

Entre los 5 y los 7 meses de edad el porcentaje de ratones YG8R que se mantuvo durante 3 o más minutos en el rota-rod a una velocidad constante (4 r.p.m.) disminuyó significativamente en comparación con el grupo WT (Fig. 14 A). En los ratones YG8R que habían recibido el tratamiento con LGF este porcentaje se mantuvo constante, alcanzando a los 8 meses de edad, valores similares al grupo WT y significativamente superiores al grupo YG8R (Fig. 14 A).

Cuando se analizó el tiempo de permanencia en aceleración en el rota-rod (4 a 40 r.p.m. en 1 minuto) se observó que, entre los 5 y los 7 meses de edad, éste parámetro estaba disminuido significativamente en los ratones YG8R tratados con vehículo en comparación con el grupo WT (Fig. 14 B). Estas diferencias no se mantuvieron en animales más longevos debido a la pérdida de coordinación motora observada entre los 7 y 8 meses de edad en los ratones WT. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los ratones YG8R que recibieron vehículo y los que fueron tratados con LGF a ninguno de los tiempos de experimentación analizados (Fig. 14 B).

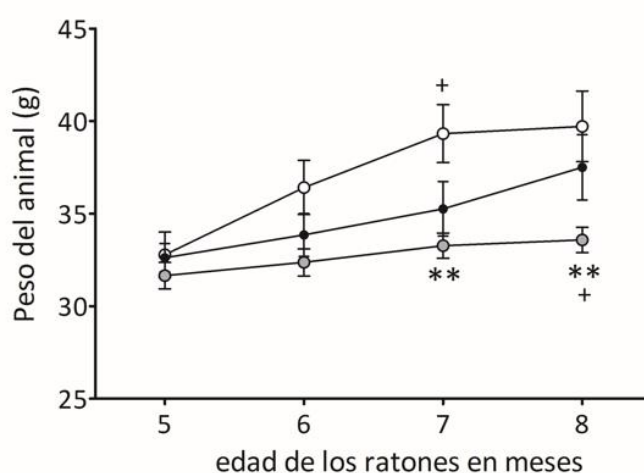


Figura 15.- Efecto del tratamiento con LGF sobre el peso corporal de los ratones YG8R. Se muestran las variaciones del peso corporal (medido en gramos) en función de la edad de los ratones WT (círculos blancos), YG8R (círculos negros) e YG8R+LGF (círculos grises). Los resultados representan la media \pm EEM de 6-8 animales independientes. ** $p < 0,01$ vs ratones WT. + $p < 0,05$ vs ratones YG8R.

Paralelamente a los estudios de coordinación motora, se analizó el efecto del tratamiento con LGF sobre el peso de los animales. Entre los 7 y 8 meses de edad los ratones YG8R tratados con vehículo incrementaron su peso corporal de forma que en el momento del sacrificio (8 meses de edad) estos animales alcanzaron un peso similar al de los ratones

WT. Sin embargo, el peso corporal de los ratones YG8R+LGF fue significativamente inferior al de los ratones WT e YG8R (Fig.15).

3.2- Efecto del tratamiento con LGF sobre la expresión de marcadores neuronales y gliales en ratones YG8R.

Los cambios observados en la conducta motora de los ratones YG8R podrían ser la consecuencia de una alteración de las neuronas sensitivas de los ganglios dorsales y/o de la médula espinal. Aparentemente no se visualizaron cambios significativos en la distribución y expresión de NeuN en la médula lumbar de los ratones YG8R, en comparación con los ratones WT (Fig. 16A). Sin embargo, cuando se cuantificó el número total de neuronas NeuN-positivas este parámetro disminuyó significativamente en los ratones YG8R (Fig.16D), observándose esta disminución predominantemente en las astas dorsales (Fig.16B).

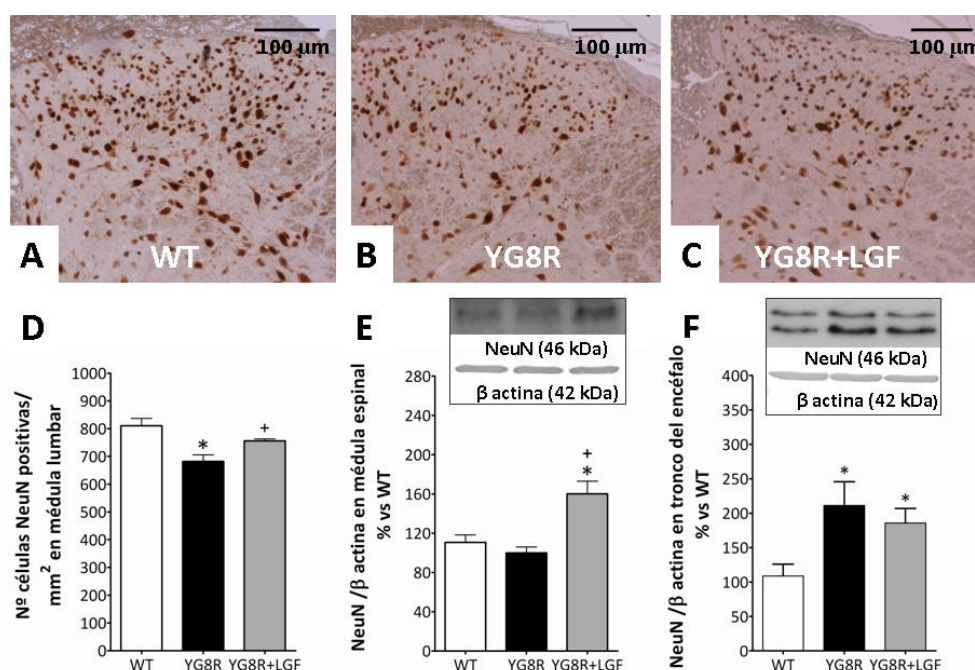


Figura 16.- Efecto del tratamiento con LGF sobre la expresión de NeuN en el SNC de ratones YG8R. En el panel superior se muestra la inmunotinción para NeuN (marrón) a nivel del asta dorsal de la médula lumbar de los ratones WT (A), los ratones YG8R tratados con vehículo (YG8R) (B) y los ratones YG8R tratados con LGF (YG8R+LGF) (C). Nótese como la inmunoreactividad para NeuN disminuye en los ratones YG8R tratados con vehículo en comparación con los ratones WT (A, B). Barra de escala: 100 μ m (A-C). En D se muestra el número de células NeuN-positivas en la medula lumbar de los ratones WT (barras blancas), YG8R (barras negras) e YG8R+LGF (barras grises). E y F muestran los resultados de western blot para NeuN en medula espinal (E) y tronco del encéfalo (F). Nótese como el tratamiento con LGF incrementa significativamente el número de células NeuN-positivas y la expresión de NeuN en la médula espinal de los ratones YG8R. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 (A-E) o 6-8 (F) animales independientes. * $p < 0,05$ vs ratones WT. + $p < 0,05$ vs ratones YG8R.

El tratamiento con LGF incrementó significativamente el número de células NeuN-positivas en la médula lumbar en comparación con los ratones YG8R tratados con vehículo (Fig.16D). En la médula torácica y cervical no se encontraron diferencias significativas en el número de células NeuN-positivas entre el grupo WT y los ratones YG8R independientemente del tratamiento aplicado (vehículo o LGF). La valoración de los niveles de NeuN por western blot no mostró diferencias significativas en la médula espinal de los ratones YG8R en comparación con los ratones WT. Sin embargo, el tratamiento con LGF incrementó significativamente este parámetro (Fig.16 E). En el resto de regiones del cerebro analizadas, tan solo encontramos cambios significativos en el tronco del encéfalo de los ratones YG8R, donde independientemente del tratamiento, se observó un incremento en la expresión de la proteína NeuN (Fig.16 F).

Otros autores han descrito la presencia de grandes vacuolas en los ganglios dorsales a nivel de la zona lumbar de la médula en los ratones YG8R de 6 a 12 meses de edad (Al-Mahdawi y cols., 2006). Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales no pudimos constatar dichas alteraciones.

La supervivencia o muerte de las neuronas afectadas depende en gran medida del grado de activación de la glía. Cuando se analizó la expresión del marcador de astrocitos GFAP, tan solo se observaron cambios significativos en el tronco del encéfalo donde los niveles de GFAP en los ratones YG8R fueron superiores a los observados en los ratones WT (Fig.17 B), y en la corteza cerebral donde, por el contrario, se observó una disminución significativa en la expresión de esta proteína (Fig.17 C). En ambos casos, el tratamiento con LGF no varió los cambios observados, por lo que asumimos que estas variaciones son una característica propia del modelo experimental.

De la misma manera, el estudio histoquímico del marcador de microglía y de microglía activada Iba1 en la sustancia gris de la médula lumbar, reveló un incremento de $1,7 \pm 0,08$ veces del número de células Iba1-positivas en los animales YG8R (N=3, $p < 0,01$ vs ratones WT) y de $1,6 \pm 0,12$ veces en los animales YG8R+LGF (N=3, $p < 0,01$ vs ratones WT) independientemente del tratamiento aplicado (dato no mostrado). Por otro lado, la expresión del marcador de microglía GLUT5, analizado mediante técnicas de western blot, disminuyó en la médula espinal de los ratones YG8R tratados con vehículo o LGF (Fig.17

D) y en el cerebelo de los ratones que recibieron vehículo (Fig.17 F) en comparación con los ratones WT.

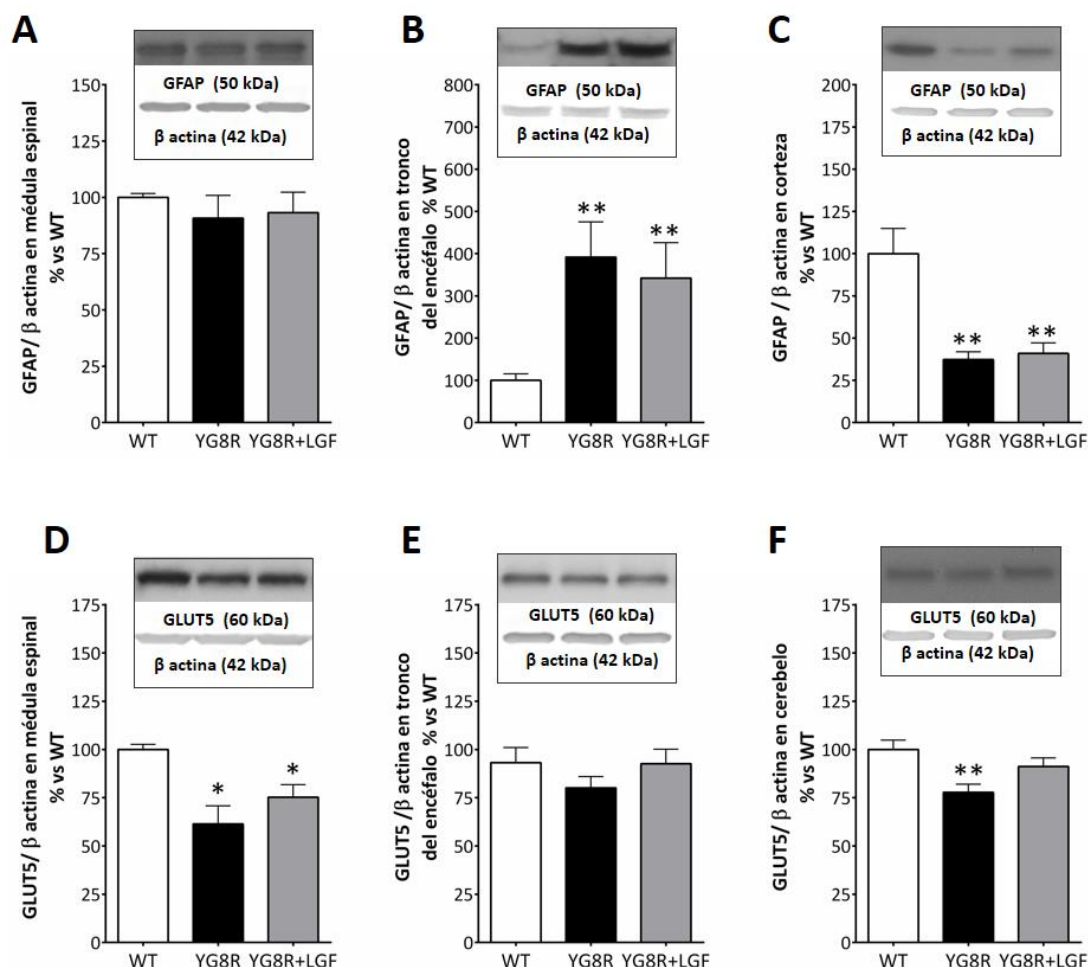


Figura 17.- Efecto del tratamiento con LGF sobre la expresión de marcadores gliales en el SNC de los ratones YG8R. En A-C se observa el efecto de LGF sobre la expresión de GFAP en la médula espinal (A), tronco del encéfalo (B) y corteza cerebral (C) de los ratones WT (barras blancas), YG8R (barras negras) e YG8R+LGF (barras grises). En D-F se observa el efecto del tratamiento con LGF sobre la expresión de GLUT5 en la médula espinal (D), tronco del encéfalo (E) y cerebelo (F) de los ratones WT (barras blancas), YG8R (barras negras) e YG8R+LGF (barras grises). Los resultados representan la media \pm EEM de 3 (A y D) y 6-8 (B-C y E-F) animales independientes. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ vs ratones WT.

3.3- Efecto del tratamiento con LGF sobre la función cardíaca en los ratones YG8R.

Uno de los órganos más afectados en la AF es el corazón, ya que como está descrito un porcentaje elevado de los pacientes desarrolla una cardiopatía hipertrófica, en concreto una hipertrofia del miocardio del ventrículo izquierdo. Tal y como se muestra en la Fig. 18 D, los ratones YG8R presentaron un aumento significativo en el diámetro de sus cardiomiocitos, no observado en los animales tratados con LGF. El tratamiento con el

factor disminuyó significativamente el diámetro de los cardiomiocitos respecto a los animales WT y a los ratones YG8R que recibieron vehículo (Fig.18 D).

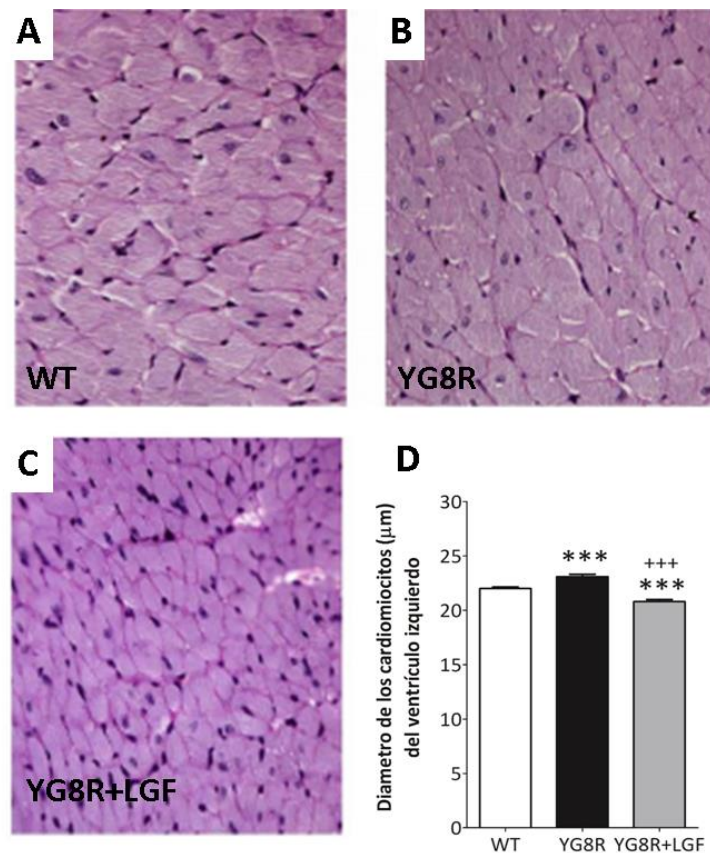


Figura 18.- Efecto del tratamiento con LGF sobre el diámetro de los cardiomiocitos en los ratones YG8R. En A-C se muestra la tinción con hematoxilina (azul) y eosina (rosa) de cortes coronales del ventrículo izquierdo de ratones WT, YG8R e YG8R+LGF. En D se muestra el diámetro de estos cardiomiocitos en los 3 grupos experimentales. Nótese como esta variable está incrementada en los ratones YG8R, y como el tratamiento con LGF previene este incremento. Los resultados en D representan la media \pm EEM de 360-420 cardiomiocitos de cada grupo experimental. *** $p < 0,001$ vs ratones WT. +++ $p < 0,001$ vs ratones YG8R.

Paralelamente se analizó la relación peso del ventrículo/peso del animal que es un parámetro utilizado para el estudio de la hipertrofia ventricular. Cuando analizamos el peso de los ventrículos izquierdos en los ratones YG8R, no observamos diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (Fig.19 A), al igual que en la relación peso del ventrículo/peso del animal (Fig.19 B). Estos resultados corresponden con los descritos para este modelo animal (Al-Mahdawi y cols., 2006), donde no se identificó un incremento del peso del corazón respecto al peso del animal.

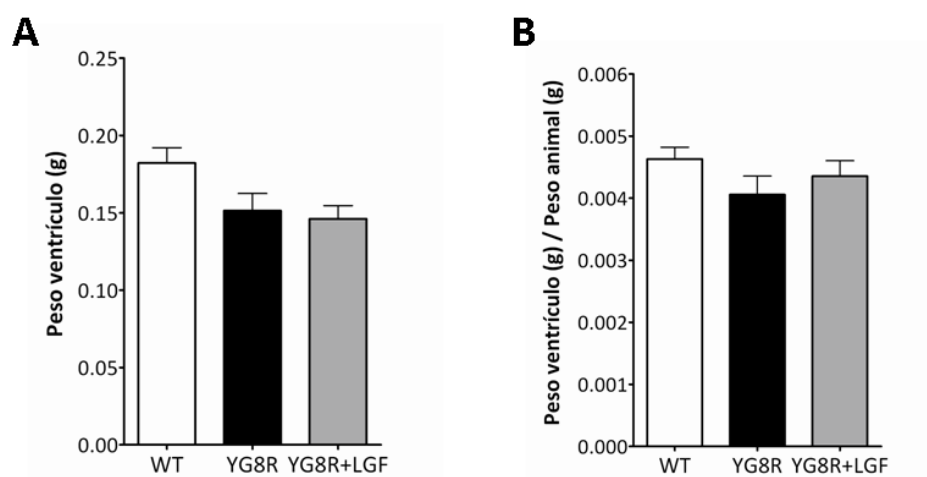


Figura 19.- Efecto del tratamiento con LGF sobre el peso ventricular y la relación peso ventrículo/peso animal en los ratones YG8R. En A se muestra el peso de los ventrículos izquierdos (medido en gramos), y en B la relación peso ventrículo/peso animal en los ratones WT (barras blancas), YG8R (barras negras) e YG8R+LGF (barras grises). Los resultados representan la media \pm EEM de 6-8 animales independientes.

3.4- Efecto del tratamiento con LGF en la expresión de Frataxina y Ferroportina en el SNC y el corazón de los ratones YG8R.

La Frataxina (FXN) es una proteína mitocondrial implicada en la homeostasis de hierro que se encuentra afectada en la AF. Por ello analizamos el papel del LGF sobre su expresión en la médula espinal, en distintas regiones del cerebro, y en el corazón de los ratones YG8R de 8-9 meses de edad.

El tratamiento con LGF incrementó significativamente la expresión de FXN en la médula espinal (Fig.20 A) y en el tronco del encéfalo de los ratones YG8R (Fig. 20 B), sin que se observaran cambios significativos en el resto de las regiones cerebrales analizadas (cerebelo y corteza cerebral). El tratamiento con LGF también incrementó los niveles de FXN en el corazón de los ratones YG8R (Fig.20 C).

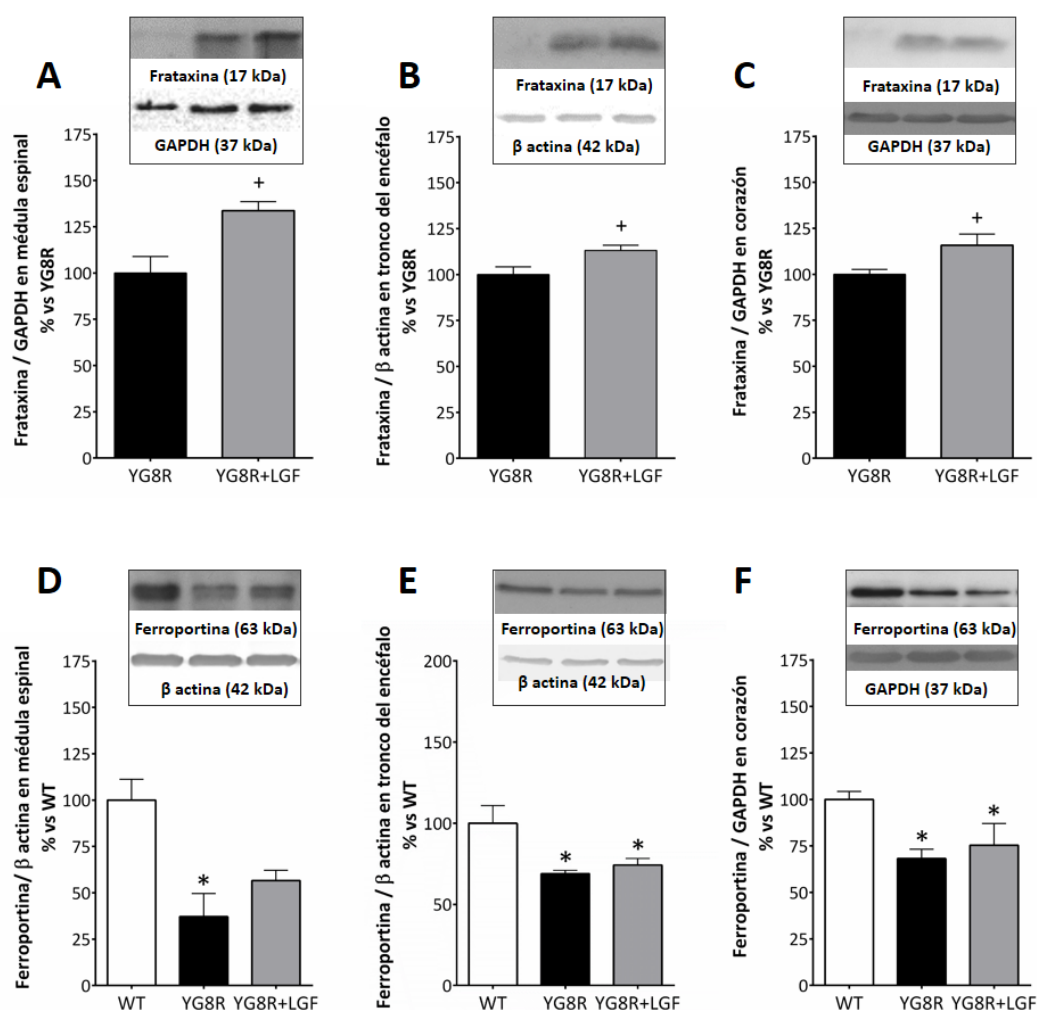


Figura 20.- Efecto del tratamiento con LGF sobre la expresión de Frataxina y Ferroportina en el SNC y corazón de ratones YG8R. En A, B y C se muestra el efecto del LGF sobre la expresión de FXN analizada mediante western blot en la médula espinal (A), el tronco del encéfalo (B) y el corazón (C). Nótese como el tratamiento con LGF estimula la expresión de FXN en todas las estructuras analizadas. En D, E y F se muestra la expresión de FPN en la médula espinal (D), el tronco del encéfalo (E) y el corazón (F) de ratones WT (barras blancas), y ratones YGR8 tratados con vehículo (barras negras) o LGF (1,7 μ g/ratón) (barras grises). Los resultados representan la media \pm EEM de 3 (A y D) y 6-8 (B-C y E-F) animales independientes. * $p < 0,05$ vs ratones WT. + $p < 0,05$ vs ratones YG8R.

Otra proteína implicada en el transporte de hierro que también se encuentra afectada en la AF es la ferroportina (FPN) (Richardson y cols., 2010). Tal y como se muestra en la médula espinal (Fig. 20 D) y el tronco del encéfalo (Fig. 20 E) de los ratones YGR8 tratados con vehículo se observó una disminución significativa en los niveles de FPN en comparación con los observados en los ratones WT, sin que se observaran cambios significativos en el cerebelo y la corteza cerebral. A diferencia de lo observado para la expresión de FXN, el tratamiento con LGF no incrementó los niveles de FPN en ninguna de las regiones del SNC analizadas. De igual manera, el tratamiento con LGF careció de

efecto sobre la expresión de FNP en el corazón, cuyos niveles se encontraron disminuidos significativamente en el músculo cardíaco de los ratones YG8R tratados o no con LGF (Fig.20 F).

3.5- Efecto del LGF sobre la expresión de proteínas implicadas en la supervivencia celular y el complejo IV de la cadena mitocondrial en el SNC y corazón de los ratones YG8R.

La proteína Akt es un efector clave en la cascada de la ruta de señalización PI3K/Akt, donde su forma fosforilada (P-Akt) juega un papel crítico en la regulación de la supervivencia neuronal (Noshita *y cols.*, 2001; Zheng y Quirion, 2006; Chakrabarty *y cols.*, 2007; Sanders *y cols.*, 2008). El tratamiento con LGF incrementó significativamente la relación P-Akt/Akt en la medula espinal de los ratones YG8R (Fig.21 A) sin que se encontraran cambios significativos en el resto de estructuras del SNC analizadas. Paralelamente, se estudió el efecto del LGF sobre la expresión de las proteínas Bcl2 (anti-apoptótica) y Bax (pro-apoptótica), no encontrándose cambios en los niveles de estas proteínas en ninguna de las estructuras estudiadas, ni en los diferentes grupos experimentales analizados en este estudio.

La proteína mitocondrial FXN está relacionada con la biosíntesis de los grupos hemo presentes en los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. El complejo IV (CIV) o citocromo C oxidasa, cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo C al O₂ para producir agua. Aunque el complejo IV no es el lugar de mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), alteraciones en dicho complejo se han asociado con un incremento en la producción de ROS en diversos tipos celulares, incluidos los linfoblastos de pacientes de AF (Napoli *y cols.*, 2006).

Los resultados de western blot en la médula espinal ponen de manifiesto una disminución de los niveles del CIV en el grupo YG8R que recibió vehículo, y como el tratamiento con LGF recuperaba este parámetro significativamente (Fig.21 D). En el cerebelo de los animales YG8R también se observó una disminución en la expresión del CIV independiente del tratamiento con LGF (Fig.21 E), mientras que en el tronco del encéfalo se observó un aumento en los niveles de CIV en los ratones YG8R tratados o no con LGF (Fig.21 F).

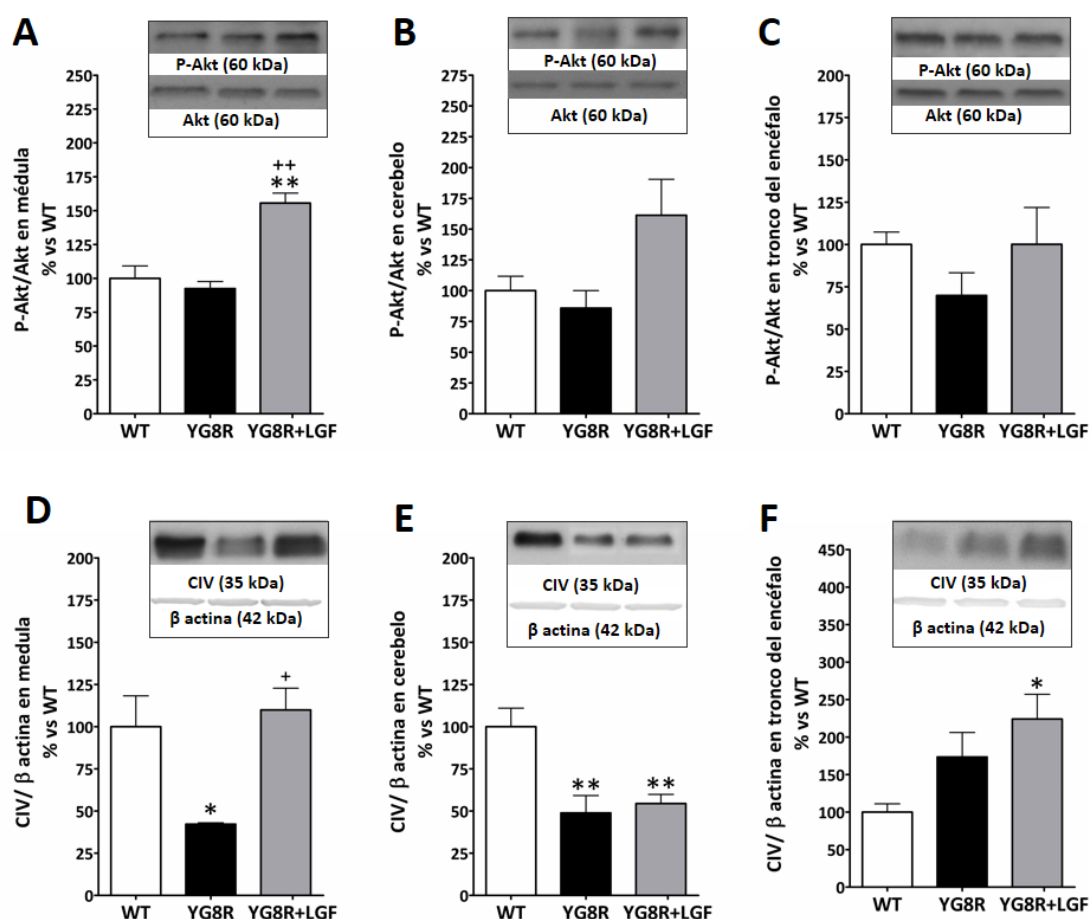


Figura 21.- Efecto del tratamiento con LGF sobre la expresión de proteínas implicadas en la supervivencia celular y el complejo IV de la cadena respiratoria. En A-C se muestra la relación P-Akt/Akt en la médula espinal (A), cerebelo (B), y tronco del encéfalo (C) de los ratones WT (barras blancas), YG8R (barras negras) e YG8R+LGF (barras grises). Nótese como el LGF incrementa significativamente esta relación en la médula espinal (A). En D-F se muestran los resultados de western blot para el complejo IV (CIV) de la cadena mitocondrial en la médula espinal (D), el cerebelo (E), y tronco del encéfalo (F). Nótese como el LGF revierte la disminución en la expresión del CIV en la médula espinal de los ratones YG8R (D). Los resultados representan la media \pm EEM de 3 (A, D) y 6-8 (B, C, E y F) animales independientes. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ vs ratones WT. + $p < 0,05$ ++ $p < 0,01$ vs ratones YG8R.

A diferencia de lo observado en el SNC, en el músculo cardíaco de los ratones YG8R tratados o no con LGF no se observaron cambios significativos ni en la relación P-Akt/Akt, ni en la expresión del CIV (datos no mostrados).

3.6- Efecto del LGF sobre los niveles de Glutación en el músculo esquelético.

La disminución en los niveles de FXN en la AF se traduce en un incremento en la acumulación de hierro mitocondrial, y un aumento del estrés oxidativo asociado al daño celular (Napoli y cols., 2006). El glutatión es el antioxidante no-enzimático más abundante

en las células, donde desempeña su papel contra las lesiones celulares inducidas por el estrés oxidativo (Hayes y McLellan, 1999).

Dada la importancia de la homeostasis del glutatión en la neurodegeneración y su uso potencial como marcador clínico de estrés oxidativo, analizamos su concentración en el músculo esquelético de los ratones YG8R tratados o no con LGF y en los WT. Tal y como se observa en la Fig.22, la relación glutatión oxidado (GSSG) vs glutatión reducido (GSH) estaba incrementada en el músculo esquelético de los ratones YG8R en comparación con los ratones WT (Fig.22). El tratamiento con LGF fue capaz de revertir este incremento, indicando que el tratamiento con el factor disminuye significativamente el estrés oxidativo asociado al desarrollo de la enfermedad, en el músculo esquelético de los ratones YG8R.

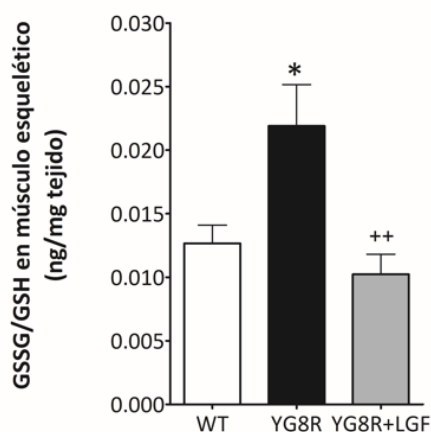


Figura 22.- El tratamiento con LGF previene el estrés oxidativo en el músculo esquelético de los ratones YG8R. En la figura se muestra la relación glutatión oxidado (GSSG) vs glutatión reducido (GSH) en el músculo esquelético de ratones WT (barra blanca) y ratones YG8R que recibieron vehículo (YG8R) (barra negra) o tratados con LGF (YG8R+LGF) (barra gris). En los ratones YG8R esta relación se encuentra incrementada significativamente respecto al grupo WT. Nótese como el tratamiento con LGF revierte este incremento. Los resultados representan la media \pm EEM de 6-8 animales independientes. * $p < 0,05$ vs ratones WT ++ $p < 0,01$ vs ratones YG8R.

4- TRATAMIENTO CON CMCUhu EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE ATAXIA CEREBELOSA INDUCIDO POR 3-AP.

4.1- El implante de CMCUhu mejora la coordinación motora en ratas lesionadas con 3-AP.

Para determinar si el implante intravenoso de CMCUhu (dosis: 4 millones de células mononucleadas/rata) tenía funcionalidad *in vivo*, analizamos la coordinación motora de los animales utilizando el test de rota-rod. Como se muestra en la Fig.23, las ratas lesionadas con 3-AP que recibieron vehículo (3-AP), sufrieron un deterioro progresivo en su coordinación motora entre los 15 y 24 días post-lesión. Por el contrario, el grupo 3-AP que recibió una única inyección de CMCUhu (3-AP+CMCUhu) a los 3 días post-lesión, alcanzó una estabilidad motora entre los 8 y 32 días post-lesión. De hecho, 21 días después del trasplante (24 días post-lesión), su coordinación motora mejoró significativamente comparado con el grupo 3-AP que recibió vehículo.

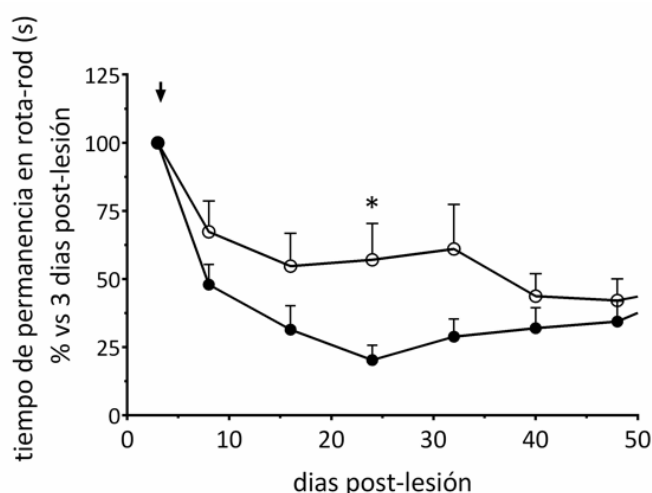


Figura 23.- Las CMCUhu mejoran la coordinación motora en las ratas lesionadas con 3-AP. El comportamiento motor evaluado por el test rota-rod (medido en segundos en aceleración), muestra una deficiencia progresiva en las ratas lesionadas con 3-AP que recibieron vehículo (círculos negros) entre los 15 y 24 días post-lesión. La coordinación motora en las ratas lesionadas con 3-AP que recibieron CMCUhu (círculos blancos) mostró una mejoría significativa a los 24 días post-lesión. Los resultados representan la media \pm EEM de 10-16 animales independientes. * $p \leq 0,05$ vs 3-AP tratadas con vehículo a 24 días post-lesión. (↓) momento del implante de CMCUhu.

4.2- Detección de CMCUhu en el tronco del encéfalo y el cerebelo de ratas lesionadas con 3-AP.

Para determinar si el trasplante intravenoso de CMCUhu era capaz de migrar hasta el tronco del encéfalo y cerebelo de las ratas atáxicas, se realizó un estudio inmunohistoquímico con el marcador específico de células humanas HLA-ABC. Siete días después del trasplante, las ratas 3-AP mostraron inmunotinción positiva para HLA-ABC en la zona ventral (Fig.24 A) y dorsal (Fig.24 C) del tronco del encéfalo. Estas células parecían estar asociadas a vasos sanguíneos positivos para laminina (Fig.24 B), o integradas en el parénquima (Fig.24 C). De manera similar, en el cerebelo de las ratas atáxicas tratadas con CMCUhu también se encontraron células positivas para HLA-ABC en la corteza cerebelosa, bien asociadas a vasos sanguíneos (Fig.24 D), o integradas en el parénquima de la capa granulosa (Fig.24 E) y molecular (Fig.24 F) de la corteza cerebelosa. Bajo nuestras condiciones experimentales, no pudimos detectar inmunoreactividad positiva para HLA-ABC a tiempos superiores a los 21 días post-implante.

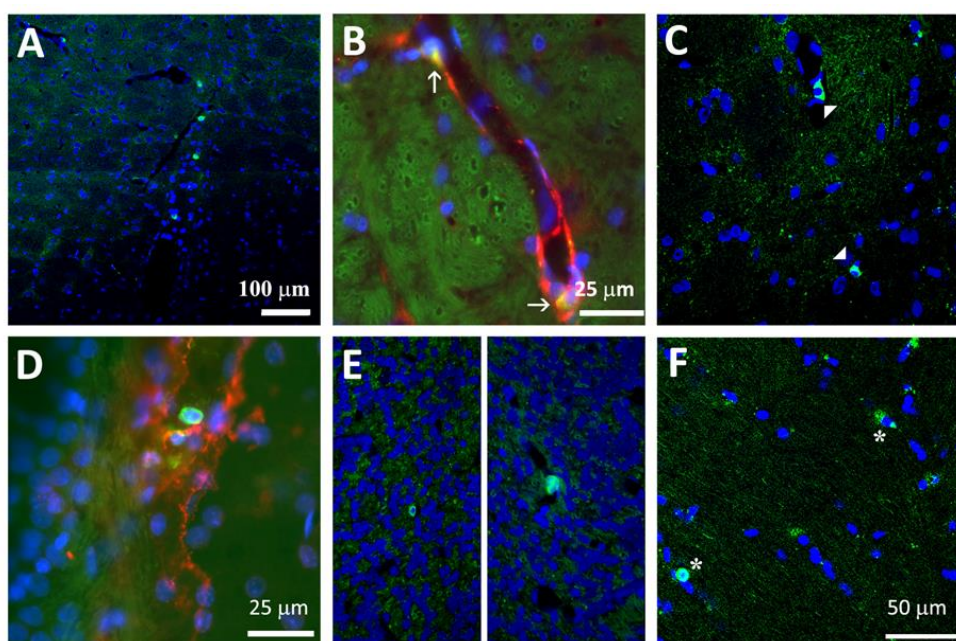


Figura 24.- Inmunodetección del antígeno leucocitario humano (HLA-ABC) en el tronco del encéfalo y cerebelo de ratas atáxicas 3-AP. En A y C se muestra la inmunodetección de HLA-ABC (verde) en la región ventral (A) y dorsal (C) del tronco del encéfalo de las ratas lesionadas con 3-AP y tratadas con CMCUhu. En B se muestra la inmunoreactividad para HLA-ABC (verde) y laminina (rojo) en la región ventral del tronco del encéfalo. Nótese como las células positivas para HLA-ABC están asociadas a los vasos sanguíneos positivos para laminina (B, amarillo, flechas blancas), o integradas en el parénquima (C, flechas blancas). En el cerebelo, las células positivas para HLA-ABC (D-F, verde) se localizaron en la corteza cerebelosa cerca de vasos sanguíneos positivos para laminina (D, rojo) y en el parénquima de la capa granulosa (E, verde) y molecular (F, verde) de la corteza cerebelosa. Los núcleos se marcaron con Hoechst 33342 (azul). Barra de escala: 25 µm (B y D), 50 µm (C, E y F) y 100 µm (A).

4.3- Las CMCUhu previenen parcialmente la pérdida neuronal en el tronco del encéfalo generada por la neurotoxina 3-AP.

La inyección de 40 mg/kg 3-AP redujo significativamente ($P \leq 0,001$, $n=6$) el número de neuronas positivas para calbindina en el nivel 2 de la oliva inferior, de 616 ± 22 a 220 ± 51 células positivas para calbindina/sección en la rata sana y en la rata 3-AP, respectivamente. Un efecto similar se observó en el nivel 1 de la oliva inferior donde el número de neuronas se redujo 1,7 veces en las ratas 3-AP ($P \leq 0,01$, $n=4$) comparadas con las ratas sanas.

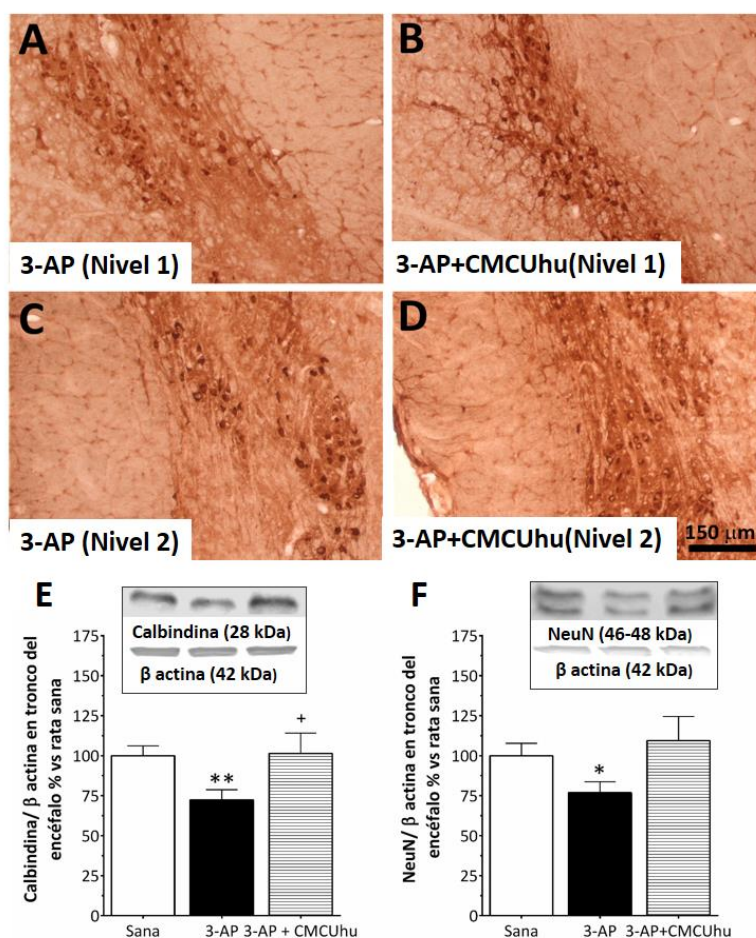


Figura 25.- Las CMCUhu previenen la pérdida neuronal en el tronco del encéfalo de las ratas 3-AP. Los paneles A-D muestran la inmunodetección para calbindina (marrón) en la oliva inferior de ratas 3-AP. A y C muestran la inmunotinción en dos niveles de la oliva inferior de ratas lesionadas con 3-AP separadas por una distancia de aproximadamente 800 μm . Nótese como el implante de CMCUhu previene la disminución del número de neuronas positivas para calbindina ocasionada por la neurotoxina en ambos niveles (B y D). Barra de escala: 150 μm . E y F muestran la detección por western blot de calbindina (E) y NeuN (F) en el tronco del encéfalo. El tratamiento con CMCUhu previene la disminución en los niveles de calbindina (E) y NeuN (F) ocasionada por la 3-AP. Los resultados representan la media \pm EEM de 6 a 9 animales individuales. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ vs rata sana. + $p \leq 0,05$ vs rata 3-AP.

Como se muestra en la Fig. 25 B y D, tras 28 días post-lesión, la inmunoreactividad para calbindina fue superior en la oliva inferior de las ratas atáxicas que recibieron CMCUhu, en

comparación con las ratas atáxicas que recibieron la administración de vehículo (Fig.25 A y C).

Los análisis por western blot para calbindina y NeuN dieron resultados similares. Así, en el tronco cerebral de las ratas 3-AP tratadas con vehículo, los niveles de calbindina (Fig.25 E) y NeuN (Fig.25 F) fueron significativamente inferiores a los encontrados en las ratas sanas y en las ratas 3-AP que recibieron el implante de CMCUhu. Este incremento en el marcador neuronal podría deberse a la diferenciación de los implantes de CMCUhu en neuronas, pero fuimos incapaces de probar esta posibilidad, ya que como hemos mencionado, no se pudo detectar la inmunoreactividad para HLA-ABC a largo plazo.

Las ratas lesionadas con 3-AP que recibieron vehículo también mostraron en el cerebelo una reducción en los niveles de expresión de calbindina y NeuN, pero el implante de CMCUhu no fue capaz de recuperar ambos parámetros (dato no mostrado).

4.4- Las CMCUhu modulan la reactividad glial en las ratas lesionadas con 3-AP.

La lesión con 3-AP incrementó de manera tiempo-dependiente el número de células IB4-positivas con morfología de microglía en la oliva inferior (Fig.26 A, B). A los 10 días post-lesión se observó una disminución en el número de células IB4-positivas en la oliva inferior de los animales atáxicos que recibieron el trasplante de CMCUhu (Fig.26 C), en comparación con aquellos que recibieron vehículo (Fig.26 A, B). Resultados parecidos se obtuvieron cuando se analizó la expresión del marcador de microglía GLUT5 en el tronco del encéfalo a los 48 días post-lesión. Así, la lesión con 3-AP incrementó significativamente los niveles de GLUT5 en comparación con los observados en el tronco del encéfalo de las ratas sanas y de las ratas atáxicas que recibieron el implante de CMCUhu (Fig.26 H).

El anticuerpo OX6 reconoce al antígeno de histocompatibilidad de clase II expresado por la microglía activada. Como se muestra en la Fig.26 I, los niveles de la proteína OX6 aumentaron en el tronco del encéfalo de las ratas 3-AP+CMCUhu. De manera similar, el número de células OX6-positivas se incrementó en la oliva inferior de las ratas 3-AP tratadas con CMCUhu (Fig.26 F) en comparación con la rata sana (Fig.26 D), y con las ratas atáxicas tratadas con vehículo (Fig.26 E). La proliferación es otra característica de la activación de la microglía. El trasplante con CMCUhu incrementó la expresión del marcador de proliferación PCNA en 1.6 veces en el tronco cerebral ($p \leq 0,01$ vs rata sana y

$p \leq 0,05$ vs 3-AP). Además, muchas de las células OX6 positivas fueron también positivas para PCNA en la oliva inferior de las ratas 3-AP+CMCUhu (Fig.26 G).

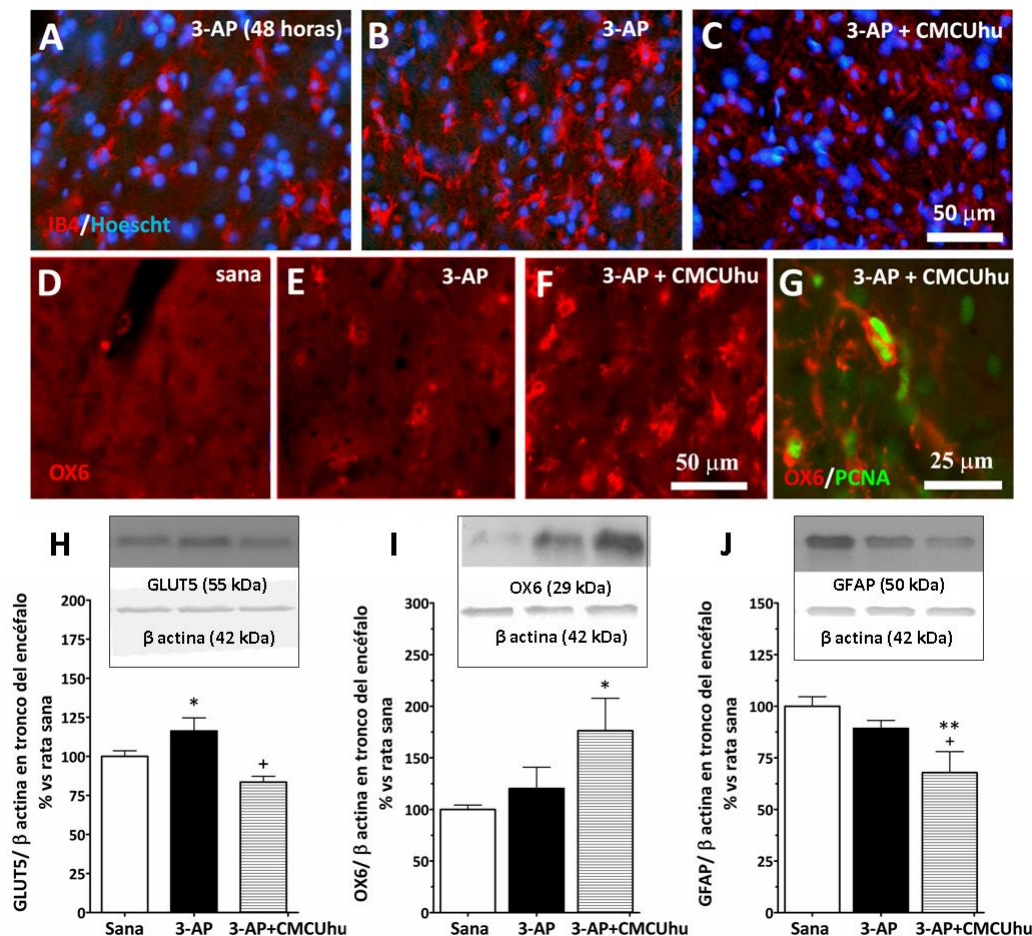


Figura 26.- Las CMCUhu modulan la reactividad glial en el tronco del encéfalo de las ratas lesionadas con 3-AP. En A y B se muestra la detección histoquímica de IB4 (rojo) en la oliva inferior de una rata lesionada con 3-AP a las 48 horas post-lesión (A) y a los 10 días post-lesión (B). Las ratas lesionadas que recibieron el implante de CMCUhu (C) mostraron un menor marcaje para IB4 que las que recibieron vehículo a los diez días post-lesión. D-G muestran el inmunomarcaje para OX6 (rojo) en la oliva inferior de la rata sana (D), ratas 3-AP tratadas con vehículo (E) y ratas 3-AP tratadas con CMCUhu (F y G). Nótese como el implante celular aumenta la inmunoreactividad para OX6 (F y G). En G se observa un doble inmunomarcaje para OX6 (rojo) y PCNA (verde). Los núcleos celulares se marcaron con Hoechst 33342 (azul). Barra de escala: 50 μ m (A-F) y 25 μ m (G). Las figuras H-J muestran los resultados de western blot para la detección de GLUT5 (H), OX6 (I) y GFAP (J) en el tronco del encéfalo. Nótese como el implante de las CMCUhu incrementa la expresión de la proteína OX6 en el tronco del encéfalo (I). Los resultados representan la media de \pm EEM de 9 a 15 animales independientes. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ vs rata sana. + $p \leq 0,05$ vs rata 3-AP.

En conjunto estos resultados sugieren que en la ataxia experimental los implantes de CMCUhu podrían ejercer un doble papel sobre la microglía, previniendo, al menos en parte, la invasión de estas células en la oliva inferior y el tronco del encéfalo, y promoviendo su activación hacia un fenotipo neuroreparador. Ello podría explicar los

efectos beneficiosos de los implantes sobre las neuronas calbindina-positivas de la oliva inferior.

El implante de CMCUhu también disminuyó significativamente la expresión de GFAP en el tronco del encéfalo (Fig.26J), sugiriendo una menor reactividad astrogial, que podría contribuir al aumento en la expresión de NeuN observado en dicha estructura.

En el cerebelo, la expresión de la proteína GLUT5 no se vio afectada por el implante de CMCUhu (Fig.27 E). Sin embargo, la inyección intravenosa de CMCUhu, sí previno el aumento en la inmunoreactividad (Fig.27 C), y en la expresión de GFAP (Fig.27 G), así como de OX6 (Fig.27 F) promovida por la 3-AP en el cerebelo.

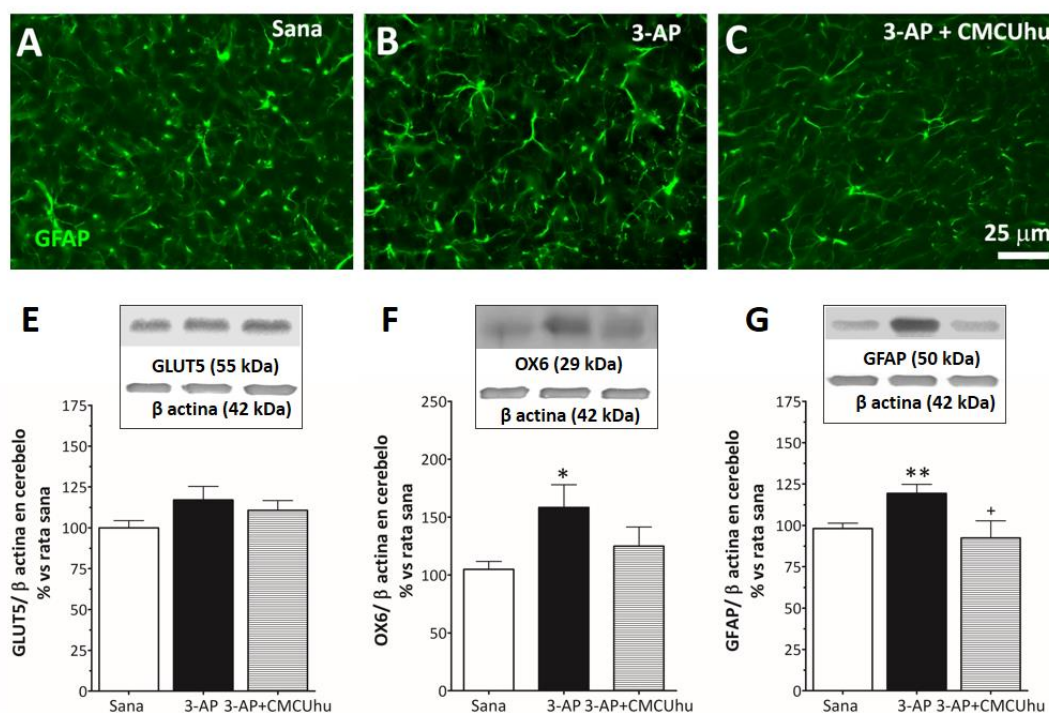


Figura 27.- Las CMCUhu modulan la reactividad glial en el cerebelo de las ratas lesionadas con 3-AP. Los paneles A-C muestran la inmunoreactividad de GFAP (verde) en el cerebelo de las ratas sanas (A) y ratas atáxicas 3-AP (B). El tratamiento con CMCUhu disminuye el marcaje para GFAP en esta estructura (C) potenciado por la neurotoxina 3-AP (B). Barra de escala: 25 μ m. Las figuras E-G muestran los resultados de western blot para la detección de GLUT5 (E), OX6 (F) y GFAP (G). Las CMCUhu previenen el incremento en la expresión de las proteínas OX6 (F) y GFAP (G) en el cerebelo provocado por la neurotoxina 3-AP. Los resultados representan la media de \pm EEM de 9 a 15 animales independientes. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ vs rata sana. + $p \leq 0,05$ vs rata 3-AP.

4.5- El implante de CMCUhu estimula la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl2 y la fosforilación de Akt.

Distintos estudios han propuesto un papel neuroprotector para las CMCUhu (Sanberg y cols., 2011). Por ello, estudiamos el efecto de las CMCUhu en la expresión de las proteínas involucradas en la supervivencia celular como Bcl2 (anti-apoptótica) y Bax (pro-apoptótica) mediante western blot. En el cerebelo de las ratas 3-AP+CMCUhu se observó un aumento significativo en la relación Bcl2/Bax en comparación con las ratas sanas y con ratas 3-AP (Fig.28 A). Este efecto se debió a un incremento en la expresión de la proteína Bcl2 (* $p \leq 0,05$ y + $p \leq 0,05$ vs rata sana y 3-AP, respectivamente), mientras que los niveles de Bax permanecieron sin cambios significativos en los distintos grupos experimentales estudiados. Por otro lado, en el tronco del encéfalo, ni los animales 3-AP, ni 3-AP+CMCUhu mostraron cambios significativos en la relación Bcl2/Bax (Fig.28 C).

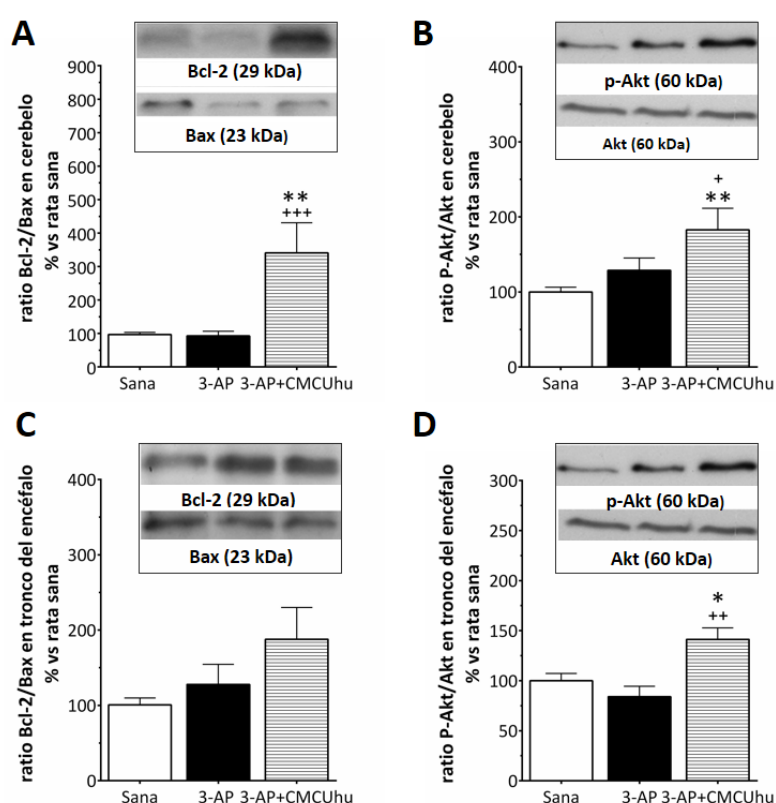


Figura 28.- Las CMCUhu incrementan la expresión de Bcl2 y P-Akt en el cerebelo y tronco del encéfalo de las ratas atáxicas 3-AP. El implante de CMCUhu aumenta la ratio Bcl2/Bax en el cerebelo de las ratas lesionadas con 3-AP (A). Las CMCUhu también incrementan la ratio P-Akt/Akt en el cerebelo (B) y tronco del encéfalo (D) de las ratas 3-AP en comparación con las ratas sanas. Los resultados representan la media de \pm EEM de 9 a 15 animales independientes. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ vs rata sana. + $p \leq 0,05$ ++ $p \leq 0,01$ +++ $p \leq 0,001$ vs rata 3-AP.

También se analizó la relación fosfo-Akt/Akt (P-Akt/Akt) en las estructuras anteriores, ya que la forma fosforilada de Akt juega un papel crítico en la regulación de la supervivencia neuronal (Noshita *y cols.*, 2001; Zhao *y cols.*, 2006). Como se muestra en la Fig. 28 B y D, la relación P-Akt/Akt estaba incrementada significativamente en el cerebelo y tronco del encéfalo de las ratas atáxicas 3-AP tratadas con CMCUhu. El implante no modificó los niveles totales de la expresión de la proteína Akt en ambas estructuras, pero si incrementó los niveles de su forma fosforilada en el cerebelo y tronco del encéfalo (* $p < 0,05$ vs cerebelo rata sana y + $p < 0,05$ vs tronco del encéfalo rata 3-AP).

Discusión

1- ACCIÓN NEUROPROTECTORA DEL LGF EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE ATAXIA CEREBELOSA.

El modelo experimental de ataxia cerebelosa en rata utilizado consiste en la destrucción selectiva de las neuronas de la oliva inferior mediante la administración de la neurotoxina 3-AP. De acuerdo con nuestros resultados, la administración de una única dosis de 40 mg/kg de 3-AP disminuyó significativamente la coordinación motora de los animales y el número de neuronas calbindina-positivas en los distintos niveles de la oliva inferior analizados, observándose una buena correlación entre ambos parámetros.

El LGF es un factor de crecimiento cuyo papel en la regeneración del SNC ha sido recientemente demostrado por nuestro grupo de investigación (Bazán y cols., 2005; Reimers y cols., 2006; Gonzalo-Gobernado y cols., 2009; Reimers y cols., 2012; Gonzalo-Gobernado y cols., 2013). El tratamiento con el factor mejoró significativamente la coordinación motora de los animales atáxicos, manteniéndose esta mejoría durante todo el periodo de experimentación analizado en esta memoria. En el Parkinson experimental el LGF ejerce un efecto neuroprotector sobre la neuronas dopaminérgicas en degeneración (Gonzalo-Gobernado y cols., 2013). De igual manera, el LGF podría proteger a las neuronas de la oliva inferior del daño provocado por la 3-AP, lo que podría explicar la mejoría motora observada. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales no se observó recuperación alguna en el número de neuronas calbindina-positivas de la oliva inferior, ni en la expresión de calbindina en el tronco del encéfalo de los animales tratados con el factor. En la oliva inferior la lesión con 3-AP incrementa la incorporación de BrdU y la expresión de PCNA, resultando la mayoría de las células en proliferación positivas para el marcador de microglía IB4, y para el marcador de microglía activada OX6. El tratamiento con LGF no previno la proliferación de la microglía ni el incremento en la expresión de OX6 promovidos por la neurotoxina, lo que podría explicar la falta de actividad neuroprotectora del LGF sobre las neuronas de la oliva inferior, ya que la presencia de microglía activada puede ser una fuente adicional de daño neuronal a través de la liberación de citoquinas que amplifican la respuesta inflamatoria (Cicchetti y cols., 2002; Reimers y cols., 2008).

A diferencia de lo observado para la calbindina, el tratamiento con LGF estimuló la expresión de la proteína NeuN en el tronco del encéfalo de las ratas atáxicas, sugiriendo su posible papel neuroprotector y/o neurogénico en dicha estructura. Aunque el LGF

tiene probada actividad neurogénica en el SNC adulto (Gonzalo-Gobernado *y cols.*, 2009), en el modelo de lesión con 3-AP utilizado no fue capaz de promover la generación de nuevas neuronas, ya que en el tronco del encéfalo no se observaron comarcajes entre las células BrdU-positivas y los distintos marcadores neurales analizados, ni cambios significativos en la expresión del marcador de neurogénesis doblecortina. Nuestros trabajos previos han demostrado la capacidad del LGF para estimular la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl2 (Reimers *y cols.*, 2012; Gonzalo-Gobernado *y cols.*, 2013). En las ratas atáxicas el tratamiento con LGF incrementó significativamente la relación Bcl2/Bax en el tronco del encéfalo. Este aumento fue debido a la potenciación de la expresión de Bcl2 por el factor, sin que se observaran cambios significativos en los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax. El análisis inmunohistoquímico de Bcl2 reveló que el aumento en la expresión de esta proteína no estaba asociado a la oliva inferior (dato no mostrado en la sección de resultados). Como Bcl2 está implicada en la supervivencia celular (Frebel y Wiese, 2006; Lossi *y cols.*, 2009), en conjunto nuestros resultados sugieren un posible papel neuroprotector del LGF sobre otras poblaciones neuronales del tronco del encéfalo no analizadas en esta memoria, como por ejemplo las neuronas de los núcleos facial e hipogloso que también se afectan parcialmente por la neurotoxina 3-AP (Seoane *y cols.*, 2005).

Independientemente de la importancia del tronco del encéfalo, la coordinación motora realmente está modulada por el cerebelo. La ablación química de la oliva con 3-AP también induce alteraciones en el cerebelo, afectando a las propiedades intrínsecas de las CP que sufren inestabilidad en su actividad (Colin *y cols.*, 1980; Cerminara y Rawson, 2004; Janahmadi *y cols.*, 2009; Kaffashian *y cols.*, 2011). Es por ello que quisimos estudiar si la mejora en el comportamiento de las ratas atáxicas tratadas con LGF podría estar relacionada con un potencial efecto positivo del factor sobre los parámetros cerebelosos afectados por la 3-AP.

Trabajos previos han demostrado que la neurotoxina 3-AP disminuye los niveles de calbindina y GLUR1 en el cerebelo (Fernandez *y cols.*, 1998; Fernandez *y cols.*, 2005a). Inmunohistoquímicamente no pudimos detectar cambios significativos en la distribución del GLUR1 y de la calbindina en las CP de las ratas lesionadas con 3-AP, pero si observamos una disminución significativa en el número de terminales calbindina-positivos de los axones que las CP envían a los núcleos profundos del cerebelo, en

concreto a las neuronas de los núcleos interpuesto y fastigial. Además, la lesión con 3-AP promovió una disminución mantenida, en el tiempo, de los niveles de GLUR1 y calbindina en el cerebelo analizados mediante técnicas de western blot. Aunque nuestros resultados difieren parcialmente de los obtenidos por otros autores que observaron una recuperación en la expresión de ambos marcadores bioquímicos de la función cerebelosa entre el primer y segundo mes post-lesión con 3-AP (Fernandez y cols., 1998; Fernandez y cols., 2005a), en conjunto indican una posible afectación de las CP en el modelo experimental de ataxia cerebelosa utilizado. De hecho, los resultados obtenidos mediante técnicas de microdiálisis en el cerebelo así lo indican, ya que la liberación de GABA inducida por KCl se encuentra afectada en la corteza cerebelosa de las ratas atáxicas.

Cuando analizamos los efectos del tratamiento con LGF sobre los parámetros arriba descritos observamos que en el cerebelo de las ratas lesionadas tratadas con el factor los niveles de calbindina eran similares a los encontrados en las ratas sanas, y significativamente superiores a los de las ratas lesionadas con 3-AP tratadas con vehículo. Además, el LGF previno parcialmente la pérdida de terminales calbindina-positivos en los núcleos profundos. A diferencia de lo observado en el tronco del encéfalo, el LGF no estimuló la expresión de Bcl2 en el cerebelo, ni promovió la activación de otras proteínas implicadas en la supervivencia celular como Akt que juega un papel importante en la acción neuroprotectora del LGF sobre las neuronas dopaminérgicas (Gonzalo-Gobernado y cols., 2013). Curiosamente, el tratamiento con el factor disminuyó el incremento en la inmunoreactividad y en la expresión del marcador de microglía activada OX6 en el cerebelo de las ratas atáxicas. La activación mantenida de la microglía en el cerebelo de las ratas lesionadas con 3-AP podría contribuir al daño observado en los terminales calbindina-positivos del cerebelo a través de la liberación de citoquinas proinflamatorias. De hecho, nuestros resultados claramente muestran como las células OX6-positivas invaden la médula y núcleos profundos del cerebelo en las ratas lesionadas con 3-AP. Trabajos previos han demostrado que la administración crónica de LGF tiene actividad antiinflamatoria *in vivo* (Diaz-Gil y cols., 1999; Diaz-Gil y cols., 2009; Gonzalo-Gobernado y cols., 2013). Nuestros resultados también sugieren un posible papel antiinflamatorio del LGF en la ataxia cerebelosa que podría explicar el efecto beneficioso del factor sobre los terminales de las CP que proyectan a los núcleos profundos y sobre la expresión de calbindina en el cerebelo.

La sobreexpresión de GFAP es una característica de astrocitos reactivos en el cerebelo de las ratas atáxicas (Fernandez *y cols.*, 1997; Shi *y cols.*, 2012)) y en pacientes con ataxia progresiva (Mittelbronn *y cols.*, 2010). En el cerebelo de las ratas lesionadas con 3-AP también encontramos incrementados los niveles de la proteína GFAP, muy probablemente debido al daño neuronal existente en esta estructura, tal y como se ha descrito en otras patologías (Chvatal *y cols.*, 2008; Buffo *y cols.*, 2010; Zhang *y cols.*, 2010). A diferencia de lo observado con la expresión de OX6, el LGF no previno la reactividad glial de los astrocitos en el cerebelo.

Además de la prevención de la activación de la microglía, el tratamiento con LGF mejoró la funcionalidad de las CP en el modelo de ataxia cerebelosa inducido por las 3-AP. Como comentamos en la introducción, las fibras aferentes del cerebelo que proceden de la oliva inferior son excitatorias y utilizan el glutamato como neurotransmisor. Mediante las técnicas de microdiálisis encontramos que la concentración extracelular basal de glutamato estaba muy incrementada en la corteza cerebelosa de las ratas atáxicas, y que tan solo la administración de dos inyecciones de LGF revertía la concentración basal de este neurotransmisor hasta alcanzar valores similares a los encontrados en la rata sana. Bajo nuestras condiciones experimentales, esta disminución en la concentración basal de glutamato no es debida a un posible efecto neuroprotector del LGF sobre las neuronas de la oliva inferior. Y aunque desconocemos si el factor puede regular la afinidad de los receptores glutamatérgicos en la corteza cerebelosa, este no es capaz de prevenir la disminución en los niveles de GLUR1 provocada por la 3-AP en el cerebelo. Está descrito que la concentración extracelular de un neurotransmisor en el estado basal es representativa de la afinidad que tienen en el SNC sus transportadores (Lerma *y cols.*, 1984; Lerma *y cols.*, 1986). De acuerdo con nuestros resultados, en la ataxia cerebelosa experimental el LGF podría prevenir el exceso de glutamato incrementando su recaptura mediante un aumento en la afinidad de sus transportadores en los terminales de las fibras trepadoras procedentes de las neuronas remanentes de la oliva inferior, y/o en las células gliales presentes en la corteza cerebelosa.

Como ya hemos comentado, los terminales gabaérgicos de las CP proyectan sobre los núcleos profundos del cerebelo, que son un grupo heterogéneo de neuronas que proyectan hacia las áreas motoras de la corteza, el tálamo, la oliva inferior y la médula espinal. La lesión con 3-AP no afectó a los niveles basales de GABA en la corteza

cerebelosa, pero sí incrementó muy significativamente la liberación de este neurotransmisor inhibitorio en dicha estructura. El incremento en la liberación de GABA puede resultar de la degeneración funcional de las CP y de otras neuronas inhibitorias como consecuencia de la lesión con 3-AP. Al estar afectada esta entrada inhibitoria se elevarían las tasas de disparo de las células de los núcleos profundos, lo que se correlaciona perfectamente con la ataxia observada en los animales lesionados (Walter y cols., 2006). De hecho, en un modelo de intoxicación con acrilamida en rata en el que se produce debilidad muscular y ataxia se ha observado un incremento en los niveles de GABA en el cerebelo (Shi y cols., 2012). Además, en un modelo de ratón con afectación para el transportador de GABA1 en el que las concentraciones de GABA son excesivas también se desarrollaron trastornos motores y ataxia (Chiu y cols., 2005). El tratamiento con LGF redujo significativamente la liberación de GABA en la corteza cerebelosa alcanzándose concentraciones de GABA extracelular similares a las observadas en las ratas no lesionadas. Al igual que lo observado para el glutamato, el tratamiento con el factor disminuyó significativamente la concentración basal de GABA, lo que podría indicar un aumento en la afinidad de los transportadores de GABA en el cerebelo. Los transportadores de GABA están involucrados en el mantenimiento de una concentración de GABA baja en el espacio extracelular cerebral, previniendo la excesiva activación tónica de los receptores sinápticos y extrasinápticos (Zhou y Danbolt, 2013). Además, los transportadores de GABA pueden revertir, tanto bajo condiciones normales como patológicas, la liberación de GABA (Richerson y Wu, 2003, 2004).

En conjunto, estos resultados indican que en el cerebelo de las ratas lesionadas con 3-AP el LGF mantiene la homeostasis del glutamato y del GABA, posiblemente, modificando al alza la afinidad de sus transportadores en dicha estructura. Ello permite mantener las concentraciones de ambos neurotransmisores a unos niveles similares a los observados en la rata sana, lo que podría explicar la mejoría conductual observada en las ratas tratadas con el factor. Además como en el SNC el exceso de actividad glutamatérgica produce activación de la microglía (Blaylock, 2013) y daño neuronal (Danbolt, 2001; Beart y O'Shea, 2007), la disminución en la concentración extracelular de este neurotransmisor provocada por el factor podría ser responsable, en parte, de la disminución en la activación de la microglía y del efecto beneficioso del LGF sobre los terminales calbindina-positivos de las CP referidos anteriormente.

2- EFECTO NEUROPROTECTOR Y ANTIOXIDANTE DEL LGF EN EL MODELO MURINO YG8R.

En la ataxia cerebelosa experimental el LGF ejerce un efecto neuroprotector sobre las CP dañadas y mejora la coordinación motora. Debido a su capacidad antioxidante y su potente actividad sobre el sistema cardiovascular, el LGF también podría ser efectivo en el tratamiento de la AF. En los ratones YG8R el LGF protegió a las neuronas sensitivas de la médula lumbar y estimuló la fosforilación de Akt en dicha estructura. El tratamiento con el factor redujo el tamaño de los cardiomiocitos en el corazón de los ratones YG8R, e incrementó significativamente los niveles de frataxina en la médula espinal, el tronco del encéfalo y el corazón. Además, el LGF disminuyó los niveles de glutatión oxidado en el músculo esquelético de los ratones YG8R.

A día de hoy, el ratón YG8R está considerado el mejor modelo animal de AF, aunque estos ratones transgénicos solo reproducen parcialmente los síntomas humanos. El ratón YG8R muestra una ataxia modesta, iniciándose a los tres meses de edad los fallos en la coordinación. A los seis meses disminuye su actividad motora en campo abierto, para acabar desarrollando ataxia en torno a los dos años de edad (Al-Mahdawi y cols., 2006). La neuropatología descrita en los ratones YG8R es parecida a la de los pacientes con AF pero menos pronunciada. Así, entre los 6 y los 12 meses de edad se han observado grandes vacuolas en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal en la médula lumbar que claramente indican su degeneración (Al-Mahdawi y cols., 2006). Bajo nuestras condiciones experimentales (animales de 8 a 9 meses de edad), no detectamos la vacuolización de dichas neuronas en ninguno de los niveles de la médula espinal analizados. Sin embargo, sí que encontramos una disminución en el número total de neuronas NeuN-positivas en la sustancia gris de la médula lumbar de los ratones YG8R, concretamente en las astas dorsales donde se sitúan las neuronas sensitivas que proyectan hacia el cerebelo por las vías espinocerebelosas anterior y posterior, y que se encuentran afectadas en la AF (Koeppen y Mazurkiewicz, 2013). El tratamiento con LGF previno esta disminución, resultando el número de células NeuN-positivas muy similar al observado en la médula lumbar de los ratones WT. Paralelamente, la administración del factor también incrementó la expresión de NeuN en la médula espinal. Estos resultados sugieren un papel neurogénico y/o neuroprotector del LGF sobre estas neuronas.

La doblecortina es una proteína que se expresa en neuronas jóvenes en migración y se utiliza como un indicador de la neurogénesis (Couillard-Despres y cols., 2005). En la

médula espinal no se observaron diferencias en los niveles de doblecortina entre los ratones YG8R tratados con vehículo o LGF (resultados no mostrados en esta memoria), por lo que consideramos que el factor carece de actividad neurogénica en dicha estructura.

Como hemos comentado anteriormente, en la ataxia cerebelosa experimental el LGF estimula la expresión de proteínas implicadas en la supervivencia celular. El tratamiento con LGF no incrementó los niveles de Bcl2 en la médula espinal de los ratones YG8R, pero estimuló la fosforilación de la proteína Akt. Como la forma fosforilada de Akt desempeña un papel importante en la regulación de la supervivencia neuronal (Noshita y cols., 2001), podemos sugerir que en la médula espinal de los ratones YG8R el LGF ejerce un efecto neuroprotector probablemente mediado por la activación de Akt. De hecho, en el Parkinson experimental esta proteína está implicada en la acción neuroprotectora del LGF sobre las neuronas dopaminérgicas dañadas (Gonzalo-Gobernado y cols., 2013).

Nuestros resultados también sugieren que en la médula espinal de los ratones YG8R el efecto neuroprotector del LGF no se debe a la prevención de la activación de la microglía. Iba1 es un marcador de microglia activada, y en un modelo de sepsis *in vivo* la activación de la microglia se ha asociado con una disminución en la expresión de GLUT5 (Garcia-Herrera y cols., 2008). En el modelo de AF utilizado, el tratamiento con LGF no disminuyó la presencia de células de microglía Iba1-positivas en la médula lumbar de los ratones YG8R, ni incrementó la expresión del marcador de microglía GLUT5 cuyos niveles estaban muy disminuidos. Resultados similares se observaron en el cerebelo de los ratones YG8R donde el LGF también fue incapaz de regular al alza la expresión de GLUT5. La inflamación crónica y la actividad de las células de la glía son factores importantes que conllevan a la neurodegeneración. Según algunos estudios en pacientes con AF, las células de Schwann y las células satélite parecen estar afectadas en los ganglios de la raíz dorsal, llegándose a sugerir que la afectación de la glía podría ser la causa de la pérdida neuronal periférica (Koeppen y cols., 2009; Lu y cols., 2009). En el modelo de AF en ratón utilizado no observamos cambios significativos en la inmunoreactividad del marcador específico de células de Schwann (S-100) en los ganglios dorsales (dato no mostrado). En cuanto a la expresión de GFAP tan solo pudimos encontrar un incremento significativo en el tronco del encéfalo y una disminución en la corteza cerebral de los ratones YG8R, que

son dos características del modelo experimental no descritas con anterioridad. Además, y aunque no lo hemos comentado en el apartado anterior, también se observó un incremento significativo, no documentado previamente, en la expresión de NeuN en el tronco del encéfalo de los ratones YG8R. El tratamiento con LGF no afectó a la expresión de GFAP en ninguna de estas estructuras, ni a la expresión de NeuN en el tronco del encéfalo de los ratones YG8R.

La cardiomiopatía hipertrófica es la principal causa de mortalidad en la AF. El corazón suele estar agrandado y muestra una miocardiopatía intersticial con necrosis o degeneración granular de unas fibras e hipertrofia de otras (Pandolfo, 2009; Koeppen, 2011; Farreras-Rozman, 2012). Aunque los ratones YG8R no muestran una disfunción cardíaca severa, sí que se han descrito una serie de alteraciones en el corazón que se asocian con la presencia de una hipertrofia cardíaca (Al-Mahdawi y cols., 2006). Cuando analizamos el peso del ventrículo izquierdo y la relación peso del ventrículo izquierdo/peso animal no observamos cambios significativos en los ratones YG8R en comparación con los animales WT. Sin embargo, cuando evaluamos el tamaño de los cardiomiocitos utilizando técnicas histológicas convencionales encontramos que éste estaba incrementado en los ratones YG8R, indicando claramente la presencia de una hipertrofia cardíaca en estos animales. En un modelo experimental de hipertensión en rata la administración crónica de LGF mejoró la función vascular (Somoza y cols., 2006) y la hipertrofia ventricular (Conde y cols., 2011). En los ratones YG8R el tratamiento con el factor disminuyó el tamaño de los cardiomiocitos en el ventrículo izquierdo, hasta un tamaño similar al observado en los animales WT. Nuestros resultados preliminares también indican que el LGF reduce el espesor de la pared ventricular en los ratones YG8R, por lo que en conjunto podemos concluir que el LGF previene la hipertrofia cardíaca en el modelo experimental de AF utilizado.

Como ya hemos comentado, en la AF se encuentra afectada la proteína FXN que está implicada en la homeostasis del hierro mitocondrial y en la biogénesis de los clusters Fe-S que forman parte de los complejos de la cadena mitocondrial (Rotig y cols., 1997; Lodi y cols., 1999; Puccio y cols., 2001; Santos y cols., 2001). En los ratones YG8R también está descrita una disminución en su expresión en distintas estructuras del SNC (Al-Mahdawi y cols., 2006). Bajo nuestras condiciones experimentales, el tratamiento con LGF incrementó los niveles de FXN en la médula espinal, en el tronco del encéfalo y en el

corazón, aunque en estas dos últimas estructuras este incremento fue muy moderado. En nuestro estudio hemos evaluado la expresión de FXN en el sobrenadante procedente de un homogeneizado de todo el tejido. Como la FXN es una proteína que se encuentra fundamentalmente en las mitocondrias, los cambios en su expresión debidos al tratamiento con LGF podrían ser más acusados si se estudiara en detalle la fracción mitocondrial. Incluso es probable que realizando el fraccionamiento subcelular, podamos encontrar cambios en los niveles de FXN en otras estructuras de SNC también afectadas en la AF como es el cerebelo. En cuanto al mecanismo que utiliza el LGF para incrementar la expresión de FXN por ahora nos es desconocido, aunque trabajos previos realizados en el hígado dañado han demostrado su capacidad para potenciar la síntesis de proteínas (Díaz-Gil y cols., 1999). Por otro lado, el LGF es un potente antioxidante (Condezo-Hoyos y cols., 2009; Surra y cols., 2010). Trabajos recientes han demostrado como el IGF-I, que también tiene una actividad antioxidante, estimula la expresión de FXN en neuronas y astrocitos deficientes en esta proteína a través de la vía de señalización Akt/mTOR (Franco y cols., 2012a). Como ya hemos discutido, en la médula espinal de los ratones YG8R el LGF estimula la fosforilación de Akt. Además, en el corazón de 3 de los 5 ratones YG8R estudiados el LGF incrementó la ratio P-Akt/Akt en $1,9 \pm 0.14$ veces, sugiriendo que AKT también participa en la regulación al alza de la FXN en nuestro estudio.

Está muy extendido que en la AF el exceso de hierro ocurre solo en la mitocondria (Huang y cols., 2009), pero también hay estudios que revelan que el exceso de hierro es más citosólico que mitocondrial (Ramírez y cols., 2012). La sobrecarga de hierro podría estar causada por un aumento en su captación y/o una disminución en la exportación de éste a través de transportadores citosólicos como la FPN. De hecho, en un estudio de pacientes con AF se ha observado la pérdida de reactividad para FPN en algunas neuronas de los ganglios de la raíz dorsal y en sus axones (Koeppen y cols., 2009). En la médula espinal y el tronco del encéfalo de los ratones YG8R encontramos una disminución significativa en la expresión de FPN no revertida por el tratamiento con LGF. Resultados similares se obtuvieron en el corazón, indicando que tanto en esta estructura, como en las arriba mencionadas, el LGF muy probablemente no es capaz de revertir la toxicidad celular producida por el aumento de hierro en el citosol.

Aunque a día de hoy la función de la FXN no está bien definida, ésta proteína tiene un papel fundamental en el metabolismo mitocondrial del hierro, más concretamente en

la biogénesis de los clusters de Fe-S (Rotig *y cols.*, 1997; Lodi *y cols.*, 1999; Puccio *y cols.*, 2001; Santos *y cols.*, 2001). El déficit de FXN conlleva la sobrecarga de hierro mitocondrial, y la desregulación de la actividad de los complejos I, II y III de la cadena respiratoria mitocondrial (Rotig *y cols.*, 1997; Cavadini *y cols.*, 2000; Llorens *y cols.*, 2007; Sutak *y cols.*, 2008; Heidari *y cols.*, 2009). Otros autores también han descrito alteraciones en el CIV en células de levadura y oligodendrogliomas deficientes en FXN (Napoli *y cols.*, 2007; Bulteau *y cols.*, 2012), y en linfoblastos de pacientes AF (Napoli *y cols.*, 2006; Bulteau *y cols.*, 2012). En el cerebelo y la médula espinal de los ratones YG8R encontramos que los niveles de expresión del CIV de la cadena respiratoria estaban muy disminuidos con relación a los ratones WT. El complejo IV cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo C al O₂ para producir agua. Por tanto, su disminución puede provocar una cesión inadecuada de electrones desde el complejo III de la cadena mitocondrial, y en consecuencia un incremento de radicales libres que muy probablemente causen daño celular en ambas estructuras. El tratamiento con LGF restituyó los niveles de CIV en la médula espinal de los ratones YG8R. Y aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos, hemos de comentar que en el corazón el tratamiento con el factor también incrementó en $1,9 \pm 0.6$ veces la expresión de esta proteína en comparación con los ratones AF que recibieron vehículo. Estos resultados podrían explicar en parte los efectos beneficiosos del LGF observados en la médula espinal y el corazón de los ratones YG8R, ya que un incremento en el CIV podría reducir la concentración de radicales libres en las neuronas y los cardiomiocitos.

En la AF la deficiencia en FXN origina una desregulación en las defensas antioxidantes, que desencadena un estado de estrés oxidativo causante en parte de la patología de la enfermedad (Gomes y Santos, 2013). El glutatión es la mejor molécula antioxidante en células eucariotas, donde puede estar libre o unido a proteínas. La forma libre se presenta mayormente en su forma reducida (GSH), que es uno de los mayores agentes neutralizantes de radicales libres en el organismo, por lo que su disminución incrementa el estrés oxidativo, caracterizado por el acúmulo de especies reactivas de oxígeno y la predisposición a la apoptosis. La deficiencia en FXN conlleva alteraciones en la homeostasis del glutatión (Piemonte *y cols.*, 2001; Napoli *y cols.*, 2006; Auchere *y cols.*, 2008; Shan *y cols.*, 2013). Además, se ha observado un aumento de glutatión unido a proteínas en sangre, fibroblastos y linfoblastos de pacientes con AF (Piemonte *y cols.*,

2001; Pastore *y cols.*, 2003; Bulteau *y cols.*, 2012). En el músculo esquelético de los ratones YG8R encontramos muy incrementada la relación GSSH/GSH, fundamentalmente debida a un incremento en la forma oxidada del glutatión GSSH. Este aumento en el estrés oxidativo puede provocar una degeneración de las fibras musculares que podría contribuir a la descoordinación motora descrita en estos ratones. El tratamiento con LGF revirtió la relación GSSG/GSH en el músculo esquelético hasta alcanzar valores similares a los observados en el ratón WT. Al prevenir el estrés oxidativo en la musculatura esquelética, el LGF podría tener un efecto beneficioso en la locomoción de los ratones AF. Además, el LGF también podría reducir el estrés oxidativo en los ganglios de la raíz dorsal de los ratones YG8R, donde también se han descrito alteraciones en la relación GSSG/GSH (Shan *y cols.*, 2013), y en el corazón debido a que este factor reduce el estrés oxidativo en el sistema cardiovascular de las ratas hipertensas (Condezo-Hoyos *y cols.*, 2012).

Finalmente, evaluamos la efectividad del tratamiento con LGF sobre la coordinación motora de los ratones YG8R. Cuando realizamos el test de rota-rod en aceleración, no observamos ninguna mejoría de la coordinación motora en los ratones YG8R tratados con el factor, en comparación con los animales que recibieron vehículo. Este resultado podría ser debido a una falta de efectividad del factor en el comportamiento motor, o a que los parámetros utilizados en aceleración (4 a 40 r.p.m. en un minuto) eran muy exigentes, lo que podría suponer un esfuerzo excesivo en estos animales con afectación motora. De hecho, en otros estudios muy recientes los autores han tenido que modificar sus protocolos para poder detectar mejorías en la conducta motora de los ratones YG8R tratados con IGF-I (Franco *y cols.*, 2012a). Y en el caso de nuestro estudio con LGF, cuando evaluamos el porcentaje de ratones que se mantuvo en el rota-rod a velocidad constante, observamos que a partir del 7º mes de edad este porcentaje era superior en los animales que habían recibido LGF. Aunque estos resultados sugieren una mejoría de su coordinación motora, tienen que ser constatados utilizando los parámetros descritos por Franco *y cols.* (4-40 r.p.m en 3-5 minutos) en el test de aceleración.

3- EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE CMCUhu EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE ATAXIA CEREBELOSA.

En la presente memoria hemos demostrado que en el modelo experimental de ataxia cerebelosa promovido por la neurotoxina 3-AP las CMCUhu administradas por vía intravenosa son capaces de migrar al tronco del encéfalo y al cerebelo. Los implantes de CMCUhu mitigaron parcialmente la pérdida neuronal inducida por la neurotoxina en el tronco del encéfalo, disminuyeron la reactividad glial en el cerebelo, y estimularon la expresión de proteínas involucradas en la supervivencia celular en ambas estructuras. Todos estos efectos se vieron acompañados por una mejoría temporal en la coordinación motora, lo que nos permite proponer el implante de CMCUhu como una terapia potencial en los desordenes cerebelosos.

Las CMCUhu están consideradas una excelente fuente de células que pueden ser utilizadas para terapias de reemplazo celular en neurodegeneración (Harris, 2008; Herranz *y cols.*, 2010; Sanberg *y cols.*, 2011; Dalous *y cols.*, 2012). En la actualidad tan solo hay dos estudios que hayan utilizado CMCUhu para el tratamiento de ataxias cerebelosas, con resultados esperanzadores en ambos casos (Yang *y cols.*, 2011; Zhang *y cols.*, 2011). En el modelo de lesión con 3-AP en rata, el implante de CMCUhu recuperó parcialmente el número de neuronas positivas para calbindina en la oliva inferior y restauró los niveles de calbindina y NeuN en el tronco cerebral. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que las CMCUhu son capaces de diferenciarse en neuronas (Zigova *y cols.*, 2002; Garbuzova-Davis *y cols.*, 2003; Chen *y cols.*, 2007; Lim *y cols.*, 2008; Low *y cols.*, 2008). Aunque bajo nuestras condiciones experimentales encontramos células positivas para HLA-ABC en el tronco del encéfalo, ninguna de ellas se localizó en la oliva inferior, sugiriendo que las CMCUhu no se diferencian a neuronas positivas para calbindina en esta estructura. Sin embargo, de nuestro estudio no podemos excluir la posibilidad de que las CMCUhu puedan diferenciarse a neuronas en el tronco del encéfalo, ya que no fuimos capaces de detectar las células positivas para HLA-ABC en el SNC después de un mes post-transplante.

Cada vez son más numerosos los trabajos científicos que sugieren que los efectos beneficiosos del transplante de las CMCUhu están asociados a la producción de factores neurotróficos (Borlongan *y cols.*, 2004; Arien-Zakay *y cols.*, 2009; Zwart *y cols.*, 2009; Bigini *y cols.*, 2011; Zhang *y cols.*, 2011). En este sentido se ha sugerido que en un modelo

de ataxia cerebelosa en ratón, el tratamiento con la fracción mesenquimal de las CMCUhu mejora el daño motor y la atrofia cerebelosa a través de la producción de IGF-I y del factor de crecimiento de endotelio vascular (Zhang y cols., 2011). En nuestro estudio no analizamos la expresión de neurotrofinas o citoquinas con propiedades antiinflamatorias, pero sí encontramos que los implantes de la fracción mononucleada de las CMCUhu potenciaban la activación de la microglía en la oliva inferior y en el tronco del encéfalo de las ratas atáxicas. Aunque la microglía activada se ha asociado con la patogénesis de distintas enfermedades neurodegenerativas, estas células pueden jugar un papel importante en la neuroprotección a través de la producción y liberación de factores neurotróficos (Streit, 2002; Rivest, 2011). De hecho, un estudio reciente ha asociado los beneficios terapéuticos del trasplante de CMCUhu en un modelo en rata de hipoxia neonatal, con una regulación a la alza de la actividad de la microglía (Bae y cols., 2012). Por el contrario, otros autores han demostrado que el bloqueo de la actividad de la microglía potencia la neuroprotección y una recuperación funcional en la isquemia cortical (Franco y cols., 2012b). De nuestros resultados no podemos deducir si la microglía activada media, o no, el incremento de los marcadores neuronales NeuN y calbindina observado en el tronco del encéfalo de las ratas atáxicas tratadas con CMCUhu. Es por ello que en el futuro se realizarán experimentos similares a los presentados en esta memoria pero utilizando agentes bloqueantes de la activación de la microglía como la minociclina (Jordan y cols., 2007).

El implante de células madre de cordón umbilical de rata previene la astrogliosis reactiva y favorece la protección neuronal en el hipocampo de ratas con isquemia (Hirko AC 2008). En el modelo de lesión con 3-AP, el implante de CMCUhu disminuyó la expresión de GFAP y su inmunoreactividad, pero no revirtió la disminución en los niveles de calbindina y NeuN promovida por la neurotoxina en el cerebelo. Estos resultados claramente indican que los implantes de CMCUhu pueden revertir la gliosis reactiva en el cerebelo de las ratas 3-AP, pero que no son suficientemente eficientes para prevenir el daño neuronal en dicha estructura. A diferencia del LGF, los implantes de CMCUhu no revirtieron el incremento en la expresión del marcador de microglía activada OX6 en el cerebelo. Ello explicaría la falta de efectividad de este tratamiento sobre las neuronas afectadas en el cerebelo, ya que la activación mantenida de la microglía podría mediar en parte la muerte neuronal en dicha estructura.

Como resultado de interés, hemos de comentar que en el modelo de ataxia cerebelosa utilizado, el trasplante de CMCUhu modula la expresión de una serie de proteínas involucradas en la supervivencia celular. Así, la administración intravenosa de CMCUhu incrementó significativamente la relación P-Akt/Akt en el cerebelo y tronco de las ratas lesionadas con 3-AP. Este efecto se debió al aumento en los niveles de P-Akt mientras los niveles de Akt totales permanecieron sin cambios en ambas estructuras. Distintos estudios han mostrado que P-Akt tiene un papel crítico en la regulación de la supervivencia neuronal inducida por CMCUhu (Dasari y cols., 2008a; Dasari y cols., 2008b), por lo que consideramos que esta proteína podría mediar la actividad neuroprotectora de las CMCUhu observada en el tronco del encéfalo. P-Akt también contribuye a la supervivencia de las células de la glía (Gabryel y cols., 2004; Dasari y cols., 2008b; Rowe y cols., 2012). Sin embargo, hasta donde nosotros sabemos, se desconoce su posible papel en la prevención de la astrogliosis. La ruta de señalización PI3K-Akt regula la expresión del factor antiapoptótico Bcl2 (Matsuzaki y cols., 1999; Tamatani y cols., 1999; Creson y cols., 2009; Zhang y cols., 2010). El trasplante de CMCUhu incrementó la expresión de la proteína Bcl2 en el cerebelo de las ratas lesionadas con 3-AP. La sobreexpresión de Bcl2 potencia la supervivencia de distintos tipos de neuronas incluyendo las de la capa granulosa del cerebelo (Sasaki y cols., 2006; Lossi y cols., 2009). Aunque este tipo neuronal no ha sido objeto de nuestro estudio, las neuronas de la capa granulosa también se encuentran afectadas en distintos tipos de ataxia. De manera adicional, Bcl2 puede contribuir al mantenimiento de los implantes celulares en el cerebelo de las ratas atáxicas 3-AP. De hecho, la sobreexpresión de Bcl2 media la supervivencia de los precursores humanos hematopoyéticos durante la vida fetal (Bonati y cols., 1996) y prolonga la supervivencia de mioblastos trasplantados en infarto de miocardio (Kitabayashi y cols., 2010) y fallo cardíaco crónico (Siltanen y cols., 2011).

Finalmente, nuestros resultados muestran que el implante de CMCUhu mejora la coordinación motora en las ratas lesionadas con 3-AP. Este efecto beneficioso probablemente sea debido a la acción neuroprotectora que ejerce el implante sobre las neuronas calbindina-positivas de la oliva inferior, y en general sobre las neuronas del tronco del encéfalo ya que, como hemos comentado anteriormente, los implantes de CMCUhu también incrementan la expresión de la proteína NeuN en dicha estructura. Paralelamente, las CMCUhu podrían modular la actividad neuronal en las ratas atáxicas.

De hecho, tras el análisis preliminar del contenido de GABA y glutamato en el tronco del encéfalo hemos observado que en las ratas 3-AP los niveles de ambos aminoácidos están incrementados en 1.4 veces con relación a los encontrados en las ratas sanas ($n=3$, $p \leq 0.001$ y $p \leq 0.05$ para GABA y glutamato, respectivamente), y que el tratamiento con CMCUhu previene esta disminución.

Bajo nuestras condiciones experimentales, la mejoría funcional debida al trasplante de CMCUhu tan solo se observó durante los primeros 24 días post-implante. Esta pérdida de actividad podría deberse a una disminución en la supervivencia de las células implantadas. Recientemente se ha sugerido que para que los implantes de CMCUhu sean más eficaces es necesario realizar inyecciones repetidas de células (Garbuzova-Davis y cols., 2012). De hecho, la inyección repetida de CMCUhu mejora durante relativamente largos periodo de tiempo el comportamiento motor en el ratón atáxico (Zhang y cols., 2011) y los síntomas funcionales en pacientes con ataxia hereditaria (Yang y cols., 2011). Puesto que nosotros administramos una única inyección intravenosa sería necesario realizar nuevos experimentos para poder determinar la efectividad de la aplicación repetida de CMCUhu en el modelo experimental de ataxia cerebelosa inducido por 3-AP. Alternativamente, nos planteamos la co-administración de CMCUhu y LGF ya que este factor mejora la eficiencia de los trasplantes de células madre neurales en el Parkinson experimental (Reimers y cols., 2012).

En resumen, los resultados de este trabajo muestran que en el cerebelo de las ratas lesionadas con 3-AP, la administración de LGF reduce la concentración extracelular de glutamato y previene la activación de la microglia. Ambos eventos podrían explicar el efecto beneficioso que ejerce el LGF sobre los terminales calbindina-positivos de las CP que proyectan sobre los núcleos profundos. Además, el tratamiento con el factor modula la liberación de GABA en el cerebelo, lo que podría explicar la mejora de la coordinación motora observada en las ratas atáxicas. En la ataxia de Friedreich experimental el LGF también ejerce un efecto neuroprotector sobre las neuronas sensoriales de la médula lumbar, potencia la expresión de FXN en la médula espinal y el corazón, reduce el estrés oxidativo en el músculo esquelético, y mejora la hipertrofia cardiaca, por lo que

podríamos considerar a este factor como un potencial agente terapéutico en el tratamiento de la AF.

Nuestros resultados también resaltan la efectividad de los implantes de CMCUhu en el tratamiento de las ataxias cerebelosas. Así, en el modelo de lesión con 3-AP la administración por vía intravenosa de estas células mitigó parcialmente la pérdida neuronal inducida por la 3-AP en la oliva inferior, disminuyó la reactividad glial en el cerebelo, y estimuló la expresión de proteínas involucradas en la supervivencia celular en ambas estructuras. Todos estos efectos se vieron acompañados por una mejoría temporal en la coordinación motora que podría verse optimizada mediante la aplicación repetida de CMCUhu, o la co-administración de CMCUhu y LGF.

Conclusiones

1.- El tratamiento con LGF estabiliza la conducta motora en animales con lesión en la oliva inferior provocada por la 3-AP. Esta mejoría conductual puede estar asociada con los efectos beneficiosos que el LGF ejerce en el cerebelo de las ratas atáxicas, ya que el tratamiento con el factor reduce los niveles de glutamato en la corteza cerebelosa, previene la activación de la microglia, incrementa la expresión de calbindina, y protege del daño provocado por la neurotoxina a los terminales calbindina-positivos de las células de Purkinje que proyectan sobre los núcleos profundos.

2.-En el modelo experimental de ataxia de Friedreich en ratón, el LGF ejerce un efecto neuroprotector sobre las neuronas sensoriales de la médula lumbar y mejora la hipertrofia cardíaca. Ambos eventos podrían ser debidos al incremento en la expresión de FXN promovido por el factor en la médula espinal y el corazón, ya que la degeneración de ambas estructuras está directamente asociada con el déficit en esta proteína.

3.- En la ataxia de Friedreich experimental, el LGF reduce el estrés oxidativo en el músculo esquelético lo que podría explicar la mejora en la coordinación motora observada en los ratones YG8R.

4.- En el modelo de lesión con 3-AP la administración por vía intravenosa de las CMCUhu reduce parcialmente la pérdida neuronal inducida por la 3-AP en la oliva inferior, previene la reactividad astrogliar en el cerebelo, y estimula la supervivencia celular en ambas estructuras. Todos estos efectos se acompañan por una mejoría temporal en la coordinación motora resaltando la efectividad de los implantes de CMCUhu en el tratamiento de las ataxias cerebelosas.

A la luz de estos resultados proponemos tanto al LGF, como a los implantes de CMCUhu como potenciales agentes terapéuticos en el tratamiento de las ataxias cerebelosas.

Referencias bibliográficas

- Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J & Eriksson PS. (2000). Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* **20**, 2896-2903.
- Al-Mahdawi S, Pinto RM, Varshney D, Lawrence L, Lowrie MB, Hughes S, Webster Z, Blake J, Cooper JM, King R & Pook MA. (2006). GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* **88**, 580-590.
- Anderson KJ, Fugaccia I & Scheff SW. (2003). Fluoro-jade B stains quiescent and reactive astrocytes in the rodent spinal cord. *J Neurotrauma* **20**, 1223-1231.
- Anheim M, Fleury M, Monga B, Laugel V, Chaigne D, Rodier G, Ginglinger E, Boulay C, Courtois S, Drouot N, Fritsch M, Delaunoy JP, Stoppa-Lyonnet D, Tranchant C & Koenig M. (2010). Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management. *Neurogenetics* **11**, 1-12.
- Arien-Zakay H, Lecht S, Bercu MM, Tabakman R, Kohen R, Galski H, Nagler A & Lazarovici P. (2009). Neuroprotection by cord blood neural progenitors involves antioxidants, neurotrophic and angiogenic factors. *Exp Neurol* **216**, 83-94.
- Auchere F, Santos R, Planamente S, Lesuisse E & Camadro JM. (2008). Glutathione-dependent redox status of frataxin-deficient cells in a yeast model of Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* **17**, 2790-2802.
- Ausim Azizi S. (2007). . . . And the olive said to the cerebellum: organization and functional significance of the olivo-cerebellar system. *Neuroscientist* **13**, 616-625.
- Babady NE, Carelle N, Wells RD, Rouault TA, Hirano M, Lynch DR, Delatycki MB, Wilson RB, Isaya G & Puccio H. (2007). Advancements in the pathophysiology of Friedreich's Ataxia and new prospects for treatments. *Mol Genet Metab* **92**, 23-35.
- Babcock M, de Silva D, Oaks R, Davis-Kaplan S, Jiralerspong S, Montermini L, Pandolfo M & Kaplan J. (1997). Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* **276**, 1709-1712.
- Backeljauw PF & Underwood LE. (2001). Therapy for 6.5-7.5 years with recombinant insulin-like growth factor I in children with growth hormone insensitivity syndrome: a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 1504-1510.
- Bachstetter AD, Pabon MM, Cole MJ, Hudson CE, Sanberg PR, Willing AE, Bickford PC & Gemma C. (2008). Peripheral injection of human umbilical cord blood stimulates neurogenesis in the aged rat brain. *BMC Neurosci* **9**, 22.
- Bae SH, Kong TH, Lee HS, Kim KS, Hong KS, Chopp M, Kang MS & Moon J. (2012). Long-lasting paracrine effects of human cord blood cells on damaged neocortex in an animal model of cerebral palsy. *Cell Transplant* **21**, 2497-2515.
- Balaban CD. (1985). Central neurotoxic effects of intraperitoneally administered 3-acetylpyridine, harmaline and niacinamide in Sprague-Dawley and Long-Evans rats: a critical review of central 3-acetylpyridine neurotoxicity. *Brain Res* **356**, 21-42.
- Bazan E, Alonso FJ, Redondo C, Lopez-Toledano MA, Alfaro JM, Reimers D, Herranz AS, Paino CL, Serrano AB, Cobacho N, Caso E & Lobo MV. (2004). In vitro and in vivo characterization of neural stem cells. *Histol Histopathol* **19**, 1261-1275.

- Bazán E, Herranz AS, Reimers D, Alonso R, Díaz-Gil JJ, Lobo MV, Paíno CL & Asensio MJ. (2005). LGF "liver growth factor" as a factor involved in the proliferation, migration and differentiation of neural stem cells: potential use in Parkinson's disease. *Mapfre Medicina* **16**, 237-247.
- Beart PM & O'Shea RD. (2007). Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br J Pharmacol* **150**, 5-17.
- Beck KD, Powell-Braxton L, Widmer HR, Valverde J & Hefti F. (1995). Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron* **14**, 717-730.
- Berretta S, Bosco G, Smecca G & Perciavalle V. (1991a). The cerebellopontine system: an electrophysiological study in the rat. *Brain Res* **568**, 178-184.
- Berretta S, Perciavalle V & Poppele RE. (1991b). Origin of spinal projections to the anterior and posterior lobes of the rat cerebellum. *J Comp Neurol* **305**, 273-281.
- Bigini P, Veglianesi P, Andriolo G, Cova L, Grignaschi G, Caron I, Daleno C, Barbera S, Ottolina A, Calzarossa C, Lazzari L, Mennini T, Bendotti C & Silani V. (2011). Intracerebroventricular administration of human umbilical cord blood cells delays disease progression in two murine models of motor neuron degeneration. *Rejuvenation Res* **14**, 623-639.
- Blaylock RL. (2013). Immunology primer for neurosurgeons and neurologists part 2: Innate brain immunity. *Surg Neurol Int* **4**, 118.
- Boddaert N, Le Quan Sang KH, Rotig A, Leroy-Willig A, Gallet S, Brunelle F, Sidi D, Thalabard JC, Munnich A & Cabantchik ZI. (2007). Selective iron chelation in Friedreich ataxia: biologic and clinical implications. *Blood* **110**, 401-408.
- Boesch S, Sturm B, Hering S, Scheiber-Mojdehkar B, Steinkellner H, Goldenberg H & Poewe W. (2008). Neurological effects of recombinant human erythropoietin in Friedreich's ataxia: a clinical pilot trial. *Mov Disord* **23**, 1940-1944.
- Bonanno G, Mariotti A, Procoli A, Corallo M, Rutella S, Pessina G, Scambia G, Mancuso S & Pierelli L. (2007). Human cord blood CD133+ cells immunoselected by a clinical-grade apparatus differentiate in vitro into endothelial- and cardiomyocyte-like cells. *Transfusion* **47**, 280-289.
- Bonati A, Albertini R, Garau D, Pinelli S, Lunghi P, Almici C, Carlo-Stella C, Rizzoli V & Dall'Aglia P. (1996). BCL2 oncogene protein expression in human hematopoietic precursors during fetal life. *Exp Hematol* **24**, 459-465.
- Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD & Sanberg PR. (2004). Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke* **35**, 2385-2389.
- Bradley JL, Homayoun S, Hart PE, Schapira AH & Cooper JM. (2004). Role of oxidative damage in Friedreich's ataxia. *Neurochem Res* **29**, 561-567.
- Broome JD, Wills KV, Lapchak PA, Ghetti B, Camp LL & Bayer SA. (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor protects midbrain dopamine neurons from the lethal action of the weaver gene: a quantitative immunocytochemical study. *Brain Res Dev Brain Res* **116**, 1-7.
- Broxmeyer HE. (2005). Biology of cord blood cells and future prospects for enhanced clinical benefit. *Cytotherapy* **7**, 209-218.
- Buffo A, Rolando C & Ceruti S. (2010). Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol* **79**, 77-89.

- Bulteau AL, O'Neill HA, Kennedy MC, Ikeda-Saito M, Isaya G & Szweda LI. (2004). Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* **305**, 242-245.
- Bulteau AL, Planamente S, Jornea L, Dur A, Lesuisse E, Camadro JM & Auchere F. (2012). Changes in mitochondrial glutathione levels and protein thiol oxidation in yfh1 yeast cells and the lymphoblasts of patients with Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 212-225.
- Butterworth RF. (1992). *Animal models of neurological disease, I: Neurodegenerative Diseases*, vol. 1.
- Calatrava L. (2011). La glía como mediadora del efecto neurotrófico del Factor de Crecimiento del Hígado (LGF) en parkinson experimental. In *IV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neurociencia (SENC)*. Salamanca.
- Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, Cova L, Hindelang C, Jiralerspong S, Trottier Y, Kish SJ, Faucheux B, Trouillas P, Authier FJ, Durr A, Mandel JL, Vescovi A, Pandolfo M & Koenig M. (1997). Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet* **6**, 1771-1780.
- Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Canizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, De Michele G, Filla A, De Frutos R, Palau F, Patel PI, Di Donato S, Mandel JL, Coccozza S, Koenig M & Pandolfo M. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423-1427.
- Carlsson A & Lindqvist M. (1973). Effect of ethanol on the hydroxylation of tyrosine and tryptophan in rat brain in vivo. *J Pharm Pharmacol* **25**, 437-440.
- Carro E, Nunez A, Busiguina S & Torres-Aleman I. (2000). Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci* **20**, 2926-2933.
- Cavadini P, Gellera C, Patel PI & Isaya G. (2000). Human frataxin maintains mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet* **9**, 2523-2530.
- Cerminara NL & Rawson JA. (2004). Evidence that climbing fibers control an intrinsic spike generator in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* **24**, 4510-4517.
- Cicchetti F, Brownell AL, Williams K, Chen YI, Livni E & Isacson O. (2002). Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur J Neurosci* **15**, 991-998.
- Colin F, Manil J & Desclin JC. (1980). The olivocerebellar system. I. Delayed and slow inhibitory effects: an overlooked salient feature of cerebellar climbing fibers. *Brain Res* **187**, 3-27.
- Conde MV, Gonzalez MC, Quintana-Villamandos B, Abderrahim F, Briones AM, Condezo-Hoyos L, Regadera J, Susin C, Gomez de Diego JJ, Delgado-Baeza E, Diaz-Gil JJ & Arribas SM. (2011). Liver growth factor treatment restores cell-extracellular matrix balance in resistance arteries and improves left ventricular hypertrophy in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H1153-1165.
- Condezo-Hoyos L, Abderrahim F, Conde MV, Susin C, Diaz-Gil JJ, Gonzalez MC & Arribas SM. (2009). Antioxidant activity of liver growth factor, a bilirubin covalently bound to albumin. *Free Radic Biol Med* **46**, 656-662.
- Condezo-Hoyos L, Arribas SM, Abderrahim F, Somoza B, Gil-Ortega M, Diaz-Gil JJ, Conde MV, Susin C & Gonzalez MC. (2012). Liver growth factor treatment reverses

- vascular and plasmatic oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **30**, 1185-1194.
- Connor B & Dragunow M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Brain Res Rev* **27**, 1-39.
- Coppola G, Marmolino D, Lu D, Wang Q, Cnop M, Rai M, Acquaviva F, Coccozza S, Pandolfo M & Geschwind DH. (2009). Functional genomic analysis of frataxin deficiency reveals tissue-specific alterations and identifies the PPARgamma pathway as a therapeutic target in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* **18**, 2452-2461.
- Cossee M, Puccio H, Gansmuller A, Koutnikova H, Dierich A, LeMeur M, Fischbeck K, Dolle P & Koenig M. (2000). Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet* **9**, 1219-1226.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG & Aigner L. (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* **21**, 1-14.
- Creson TK, Yuan P, Manji HK & Chen G. (2009). Evidence for involvement of ERK, PI3K, and RSK in induction of Bcl-2 by valproate. *J Mol Neurosci* **37**, 123-134.
- Chakrabarty K, Serchov T, Mann SA, Dietzel ID & Heumann R. (2007). Enhancement of dopaminergic properties and protection mediated by neuronal activation of Ras in mouse ventral mesencephalic neurones. *Eur J Neurosci* **25**, 1971-1981.
- Chamberlain S, Worrall C & Williamson R. (1988). Attempts to identify the chromosomal localization of the Friedreich's ataxia locus. *Adv Neurol* **48**, 257-260.
- Chen HK, Fernandez-Funez P, Acevedo SF, Lam YC, Kaytor MD, Fernandez MH, Aitken A, Skoulakis EM, Orr HT, Botas J & Zoghbi HY. (2003). Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell* **113**, 457-468.
- Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, Sanchez-Ramos J & Chopp M. (2001). Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* **32**, 2682-2688.
- Chen N, Hudson JE, Walczak P, Misiuta I, Garbuzova-Davis S, Jiang L, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR, Zigova T & Willing AE. (2005). Human umbilical cord blood progenitors: the potential of these hematopoietic cells to become neural. *Stem Cells* **23**, 1560-1570.
- Chen N, Kamath S, Newcomb J, Hudson J, Garbuzova-Davis S, Bickford P, Davis-Sanberg C, Sanberg P, Zigova T & Willing A. (2007). Trophic factor induction of human umbilical cord blood cells in vitro and in vivo. *J Neural Eng* **4**, 130-145.
- Chen N, Newcomb J, Garbuzova-Davis S, Davis Sanberg C, Sanberg PR & Willing AE. (2010). Human Umbilical Cord Blood Cells Have Trophic Effects on Young and Aging Hippocampal Neurons in Vitro. *Aging Dis* **1**, 173-190.
- Chen R & Ende N. (2000). The potential for the use of mononuclear cells from human umbilical cord blood in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis in SOD1 mice. *J Med* **31**, 21-30.
- Chiu CS, Brickley S, Jensen K, Southwell A, McKinney S, Cull-Candy S, Mody I & Lester HA. (2005). GABA transporter deficiency causes tremor, ataxia, nervousness, and increased GABA-induced tonic conductance in cerebellum. *J Neurosci* **25**, 3234-3245.

- Cho SG, Yi SY & Yoo YS. (2005). IFN γ and TNF α synergistically induce neurite outgrowth on PC12 cells. *Neurosci Lett* **378**, 49-54.
- Chvatal A, Anderova M, Neprasova H, Prajerova I, Benesova J, Butenko O & Verkhatsky A. (2008). Pathological potential of astroglia. *Physiol Res* **57 Suppl 3**, S101-110.
- Dalous J, Larghero J & Baud O. (2012). Transplantation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a novel strategy to protect the central nervous system: technical aspects, preclinical studies, and clinical perspectives. *Pediatr Res* **71**, 482-490.
- Damjanac M, Rioux Bilan A, Barrier L, Pontcharraud R, Anne C, Hugon J & Page G. (2007). Fluoro-Jade B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res* **1128**, 40-49.
- Danbolt NC. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* **65**, 1-105.
- Dasari VR, Spomar DG, Li L, Gujrati M, Rao JS & Dinh DH. (2008a). Umbilical cord blood stem cell mediated downregulation of fas improves functional recovery of rats after spinal cord injury. *Neurochem Res* **33**, 134-149.
- Dasari VR, Veeravalli KK, Saving KL, Gujrati M, Fassett D, Klopfenstein JD, Dinh DH & Rao JS. (2008b). Neuroprotection by cord blood stem cells against glutamate-induced apoptosis is mediated by Akt pathway. *Neurobiol Dis* **32**, 486-498.
- Del Gaizo V & Payne RM. (2003). A novel TAT-mitochondrial signal sequence fusion protein is processed, stays in mitochondria, and crosses the placenta. *Mol Ther* **7**, 720-730.
- Delatycki MB & Corben LA. (2012). Clinical features of Friedreich ataxia. *J Child Neurol* **27**, 1133-1137.
- Desclin JC & Escubi J. (1974). Effects of 3-acetylpyridine on the central nervous system of the rat, as demonstrated by silver methods. *Brain Res* **77**, 349-364.
- Diaz-Gil JJ, Escartin P, Garcia-Canero R, Trilla C, Veloso JJ, Sanchez G, Moreno-Caparrós A, Enrique de Salamanca C, Lozano R, Gavilanes JG & et al. (1986a). Purification of a liver DNA-synthesis promoter from plasma of partially hepatectomized rats. *Biochem J* **235**, 49-55.
- Diaz-Gil JJ, Garcia-Monzon C, Rua C, Martin-Sanz P, Cereceda RM, Miquilena-Colina ME, Machin C, Fernandez-Martinez A & Garcia-Canero R. (2008). The anti-fibrotic effect of liver growth factor is associated with decreased intrahepatic levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 and transforming growth factor beta 1 in bile duct-ligated rats. *Histol Histopathol* **23**, 583-591.
- Diaz-Gil JJ, Garcia-Monzon C, Rua C, Martin-Sanz P, Cereceda RM, Miquilena-Colina ME, Machin C, Fernandez-Martinez A & Garcia-Canero R. (2009). Liver growth factor antifibrotic activity in vivo is associated with a decrease in activation of hepatic stellate cells. *Histol Histopathol* **24**, 473-479.
- Diaz-Gil JJ, Gavilanes JG, Garcia-Canero R, Garcia-Segura JM, Santamaria L, Trilla C, Martin AM, Guerra MA, Garcia-Escandon F, Iniguez JA & et al. (1989). Liver growth factor purified from human plasma is an albumin-bilirubin complex. *Mol Biol Med* **6**, 197-207.
- Diaz-Gil JJ, Gavilanes JG, Sanchez G, Garcia-Canero R, Garcia-Segura JM, Santamaria L, Trilla C & Escartin P. (1987). Identification of a liver growth factor as an albumin-bilirubin complex. *Biochem J* **243**, 443-448.
- Diaz-Gil JJ, Majano PL, Lopez-Cabrera M, Sanchez-Lopez V, Rua C, Machin C, Trilla C, Garcia-Canero R & Moreno-Otero R. (2003). The mitogenic activity of the liver

- growth factor is mediated by tumor necrosis factor alpha in rat liver. *J Hepatol* **38**, 598-604.
- Diaz-Gil JJ, Munoz J, Albillos A, Rua C, Machin C, Garcia-Canero R, Cereceda RM, Guijarro MC, Trilla C & Escartin P. (1999). Improvement in liver fibrosis, functionality and hemodynamics in CCl4-cirrhotic rats after injection of the Liver Growth Factor. *J Hepatol* **30**, 1065-1072.
- Diaz-Gil JJ, Sanchez G, Santamaria L, Trilla C, Esteban P & Escartin P. (1986b). Liver DNA synthesis promoter activity detected in human plasma from subjects with hepatitis. *Hepatology* **6**, 658-661.
- Diaz-Gil JJ, Sanchez G, Trilla C & Escartin P. (1988). Identification of biliprotein as a liver growth factor. *Hepatology* **8**, 484-486.
- Diaz Gil JJ, Rua C, Machin C, Cereceda RM, Garcia-Canero R, de Foronda M, Perez de Diego J, Trilla C & Escartin P. (1994). Hepatic growth induced by injection of the liver growth factor into normal rats. *Growth Regul* **4**, 113-122.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM & Alvarez-Buylla A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703-716.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D & Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317.
- Durr A. (2010). Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol* **9**, 885-894.
- Ekerot CF, Jorntell H & Garwicz M. (1995). Functional relation between corticonuclear input and movements evoked on microstimulation in cerebellar nucleus interpositus anterior in the cat. *Exp Brain Res* **106**, 365-376.
- Emond M, Lepage G, Vanasse M & Pandolfo M. (2000). Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology* **55**, 1752-1753.
- Ende N & Chen R. (2001). Human umbilical cord blood cells ameliorate Huntington's disease in transgenic mice. *J Med* **32**, 231-240.
- Ende N, Chen R & Ende-Harris D. (2001). Human umbilical cord blood cells ameliorate Alzheimer's disease in transgenic mice. *J Med* **32**, 241-247.
- Erceg S, Moreno-Manzano V, Garita-Hernandez M, Stojkovic M & Bhattacharya SS. (2011). Concise review: stem cells for the treatment of cerebellar-related disorders. *Stem Cells* **29**, 564-569.
- Erceg S, Ronaghi M, Zipancic I, Lainez S, Rosello MG, Xiong C, Moreno-Manzano V, Rodriguez-Jimenez FJ, Planells R, Alvarez-Dolado M, Bhattacharya SS & Stojkovic M. (2010). Efficient differentiation of human embryonic stem cells into functional cerebellar-like cells. *Stem Cells Dev* **19**, 1745-1756.
- Farreras-Rozman. (2012). *Medicina interna*.
- Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD & Sidwell RW. (2008). The role of cerebellar genes in pathology of autism and schizophrenia. *Cerebellum* **7**, 279-294.
- Feldman EL, Sullivan KA, Kim B & Russell JW. (1997). Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival. *Neurobiol Dis* **4**, 201-214.
- Fernandez-Espejo E. (2004). Pathogenesis of Parkinson's disease: prospects of neuroprotective and restorative therapies. *Mol Neurobiol* **29**, 15-30.

- Fernandez AM, Carro EM, Lopez-Lopez C & Torres-Aleman I. (2005a). Insulin-like growth factor I treatment for cerebellar ataxia: addressing a common pathway in the pathological cascade? *Brain Res Brain Res Rev* **50**, 134-141.
- Fernandez AM, de la Vega AG & Torres-Aleman I. (1998). Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1253-1258.
- Fernandez AM, Garcia-Estrada J, Garcia-Segura LM & Torres-Aleman I. (1997). Insulin-like growth factor I modulates c-Fos induction and astrogliosis in response to neurotoxic insult. *Neuroscience* **76**, 117-122.
- Fernandez AM & Torres-Aleman I. (2012). The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci* **13**, 225-239.
- Fernandez M, Sanchez-Franco F, Palacios N, Sanchez I & Cacicedo L. (2005b). IGF-I and vasoactive intestinal peptide (VIP) regulate cAMP-response element-binding protein (CREB)-dependent transcription via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in pituitary cells: requirement of Rap1. *J Mol Endocrinol* **34**, 699-712.
- Fontaine V, Mohand-Said S, Hanoteau N, Fuchs C, Pfizenmaier K & Eisel U. (2002). Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci* **22**, RC216.
- Franco C, Fernandez S & Torres-Aleman I. (2012a). Frataxin deficiency unveils cell-context dependent actions of insulin-like growth factor I on neurons. *Mol Neurodegener* **7**, 51.
- Franco EC, Cardoso MM, Gouveia A, Pereira A & Gomes-Leal W. (2012b). Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia. *Neurosci Res* **73**, 122-132.
- Frebel K & Wiese S. (2006). Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation. *Biochem Soc Trans* **34**, 1287-1290.
- Gabryel B, Pudenko A & Malecki A. (2004). Erk1/2 and Akt kinases are involved in the protective effect of aniracetam in astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *Eur J Pharmacol* **494**, 111-120.
- Garbuzova-Davis S, Rodrigues MC, Mirtyl S, Turner S, Mitha S, Sodhi J, Suthakaran S, Eve DJ, Sanberg CD, Kuzmin-Nichols N & Sanberg PR. (2012). Multiple intravenous administrations of human umbilical cord blood cells benefit in a mouse model of ALS. *PLoS One* **7**, e31254.
- Garbuzova-Davis S, Willing AE, Saporta S, Bickford PC, Gemma C, Chen N, Sanberg CD, Klasko SK, Borlongan CV & Sanberg PR. (2006a). Novel cell therapy approaches for brain repair. *Prog Brain Res* **157**, 207-222.
- Garbuzova-Davis S, Willing AE, Saporta S, Justen EB, Misiuta IE, Dellis J & Sanberg PR. (2006b). Multiple transplants of hNT cells into the spinal cord of SOD1 mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* **7**, 221-226.
- Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, Lane JC, Hudson JE, Chen N, Davis CD & Sanberg PR. (2003). Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res* **12**, 255-270.

- Garcia-Herrera J, Marca MC, Brot-Laroche E, Guillen N, Acin S, Navarro MA, Osada J & Rodriguez-Yoldi MJ. (2008). Protein kinases, TNF- α , and proteasome contribute in the inhibition of fructose intestinal transport by sepsis in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, G155-164.
- Giovannucci E. (2003). Nutrition, insulin, insulin-like growth factors and cancer. *Horm Metab Res* **35**, 694-704.
- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P & et al. (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* **321**, 1174-1178.
- Gomes CM & Santos R. (2013). Neurodegeneration in Friedreich's ataxia: from defective frataxin to oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 487534.
- González-Cabo P & Palau F. (2013). Mitochondrial pathophysiology in Friedreich's ataxia. *Journal of Neurochemistry* **126**, 53-64.
- Gonzalo-Gobernado R, Calatrava-Ferreras L, Reimers D, Herranz AS, Rodriguez-Serrano M, Miranda C, Jimenez-Escrig A, Diaz-Gil JJ & Bazan E. (2013). Neuroprotective activity of peripherally administered liver growth factor in a rat model of Parkinson's disease. *PLoS One* **8**, e67771.
- Gonzalo-Gobernado R, Reimers D, Herranz AS, Diaz-Gil JJ, Osuna C, Asensio MJ, Baena S, Rodriguez-Serrano M & Bazan E. (2009). Mobilization of neural stem cells and generation of new neurons in 6-OHDA-lesioned rats by intracerebroventricular infusion of liver growth factor. *J Histochem Cytochem* **57**, 491-502.
- Gottesfeld JM. (2007). Small molecules affecting transcription in Friedreich ataxia. *Pharmacol Ther* **116**, 236-248.
- Griffith OW. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* **106**, 207-212.
- Gross A, McDonnell JM & Korsmeyer SJ. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**, 1899-1911.
- Harding AE & Hewer RL. (1983). The heart disease of Friedreich's ataxia: a clinical and electrocardiographic study of 115 patients, with an analysis of serial electrocardiographic changes in 30 cases. *Q J Med* **52**, 489-502.
- Harkins AB & Fox AP. (2002). Cell death in weaver mouse cerebellum. *Cerebellum* **1**, 201-206.
- Harris DT. (2008). Cord blood stem cells: a review of potential neurological applications. *Stem Cell Rev* **4**, 269-274.
- Hayes JD & McLellan LI. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* **31**, 273-300.
- Heidari MM, Houshmand M, Hosseinkhani S, Nafissi S & Khatami M. (2009). Complex I and ATP content deficiency in lymphocytes from Friedreich's ataxia. *Can J Neurol Sci* **36**, 26-31.
- Herranz AS, Gonzalo-Gobernado R, Reimers D, Asensio MJ, Rodriguez-Serrano M & Bazan E. (2010). Applications of human umbilical cord blood cells in central nervous system regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther* **5**, 17-22.
- Hershenson J, Haworth A & Houlden H. (2012). The inherited ataxias: genetic heterogeneity, mutation databases, and future directions in research and clinical diagnostics. *Hum Mutat* **33**, 1324-1332.

- Hess BH, Krewet JA & Tolbert DL. (2003). Olivocerebellar projections are necessary for exogenous trophic factors to delay heredo-Purkinje cell degeneration. *Brain Res* **986**, 54-62.
- Huang C. (2008). Implications on cerebellar function from information coding. *Cerebellum* **7**, 314-331.
- Huang ML, Becker EM, Whitnall M, Suryo Rahmanto Y, Ponka P & Richardson DR. (2009). Elucidation of the mechanism of mitochondrial iron loading in Friedreich's ataxia by analysis of a mouse mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16381-16386.
- Hung J, Chansard M, Ousman SS, Nguyen MD & Colicos MA. (2010). Activation of microglia by neuronal activity: results from a new in vitro paradigm based on neuronal-silicon interfacing technology. *Brain Behav Immun* **24**, 31-40.
- Jacobson GA, Rokni D & Yarom Y. (2008). A model of the olivo-cerebellar system as a temporal pattern generator. *Trends Neurosci* **31**, 617-625.
- Janahmadi M, Goudarzi I, Kaffashian MR, Behzadi G, Fathollahi Y & Hajizadeh S. (2009). Co-treatment with riluzole, a neuroprotective drug, ameliorates the 3-acetylpyridine-induced neurotoxicity in cerebellar Purkinje neurones of rats: behavioural and electrophysiological evidence. *Neurotoxicology* **30**, 393-402.
- Jelsma TN & Aguayo AJ. (1994). Trophic factors. *Curr Opin Neurobiol* **4**, 717-725.
- Jones BN, Pääbo S & Stein S. (1981). Amino Acid Analysis and Enzymatic Sequence Determination of Peptides by an Improved o-Phthaldialdehyde Precolumn Labeling Procedure. *Journal of Liquid Chromatography* **4**, 565-586.
- Jordan J, Fernandez-Gomez FJ, Ramos M, Ikuta I, Aguirre N & Galindo MF. (2007). Minocycline and cytoprotection: shedding new light on a shadowy controversy. *Curr Drug Deliv* **4**, 225-231.
- Juvonen V, Hietala M, Kairisto V & Savontaus ML. (2005). The occurrence of dominant spinocerebellar ataxias among 251 Finnish ataxia patients and the role of predisposing large normal alleles in a genetically isolated population. *Acta Neurol Scand* **111**, 154-162.
- Juvonen V, Hietala M, Paivarinta M, Rantamaki M, Hakamies L, Kaakkola S, Vierimaa O, Penttinen M & Savontaus ML. (2000). Clinical and genetic findings in Finnish ataxia patients with the spinocerebellar ataxia 8 repeat expansion. *Ann Neurol* **48**, 354-361.
- Kaffashian M, Shabani M, Goudarzi I, Behzadi G, Zali A & Janahmadi M. (2011). Profound alterations in the intrinsic excitability of cerebellar Purkinje neurons following neurotoxin 3-acetylpyridine (3-AP)-induced ataxia in rat: new insights into the role of small conductance K⁺ channels. *Physiol Res* **60**, 355-365.
- Kahle W. (2003). *Atlas de anatomía*, vol. 3.
- Kearney M, Orrell RW, Fahey M & Pandolfo M. (2009). Antioxidants and other pharmacological treatments for Friedreich ataxia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007791.
- Kemp K, Mallam E, Hares K, Witherick J, Scolding N & Wilkins A. (2011). Mesenchymal stem cells restore frataxin expression and increase hydrogen peroxide scavenging enzymes in Friedreich ataxia fibroblasts. *PLoS One* **6**, e26098.
- Kerber KA, Jen JC, Perlman S & Baloh RW. (2005). Late-onset pure cerebellar ataxia: differentiating those with and without identifiable mutations. *J Neurol Sci* **238**, 41-45.

- Kitabayashi K, Siltanen A, Patila T, Mahar MA, Tikkanen I, Koponen J, Ono M, Sawa Y, Kankuri E & Harjula A. (2010). Bcl-2 expression enhances myoblast sheet transplantation therapy for acute myocardial infarction. *Cell Transplant* **19**, 573-588.
- Klockgether T. (2011). Update on degenerative ataxias. *Curr Opin Neurol* **24**, 339-345.
- Koeppen AH. (2011). Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J Neurol Sci* **303**, 1-12.
- Koeppen AH, Davis AN & Morral JA. (2011). The cerebellar component of Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol* **122**, 323-330.
- Koeppen AH & Mazurkiewicz JE. (2013). Friedreich ataxia: neuropathology revised. *J Neuropathol Exp Neurol* **72**, 78-90.
- Koeppen AH, Morral JA, Davis AN, Qian J, Petrocine SV, Knutson MD, Gibson WM, Cusack MJ & Li D. (2009). The dorsal root ganglion in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol* **118**, 763-776.
- Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E & Wernet P. (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* **200**, 123-135.
- Koutnikova H, Campuzano V, Foury F, Dolle P, Cazzalini O & Koenig M. (1997). Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet* **16**, 345-351.
- Kucia M, Wysoczynski M, Ratajczak J & Ratajczak MZ. (2008). Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell Tissue Res* **331**, 125-134.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai EC, Felice KJ, Festoff BW, Gawel MJ, Gelinas DF, Kratz R, Murphy MF, Natter HM, Norris FH & Rudnicki SA. (1997). Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-I Study Group. *Neurology* **49**, 1621-1630.
- Lamarche JB, Cote M & Lemieux B. (1980). The cardiomyopathy of Friedreich's ataxia morphological observations in 3 cases. *Can J Neurol Sci* **7**, 389-396.
- Lee SI, Kim BG, Hwang DH, Kim HM & Kim SU. (2009). Overexpression of Bcl-XL in human neural stem cells promotes graft survival and functional recovery following transplantation in spinal cord injury. *J Neurosci Res* **87**, 3186-3197.
- Leininger GM & Feldman EL. (2005). Insulin-like growth factors in the treatment of neurological disease. *Endocr Dev* **9**, 135-159.
- Lerma J, Herranz AS, Herreras O, Abaira V & Martin del Rio R. (1986). In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Res* **384**, 145-155.
- Lerma J, Herreras O, Herranz AS, Munoz D & del Rio RM. (1984). In vivo effects of nipecotic acid on levels of extracellular GABA and taurine, and hippocampal excitability. *Neuropharmacology* **23**, 595-598.
- Liang J, Takeuchi H, Jin S, Noda M, Li H, Doi Y, Kawanokuchi J, Sonobe Y, Mizuno T & Suzumura A. (2010). Glutamate induces neurotrophic factor production from microglia via protein kinase C pathway. *Brain Res* **1322**, 8-23.

- Liebman M. (1991). *Neuroanatomy made easy and understandable*.
- Lim JY, Park SI, Oh JH, Kim SM, Jeong CH, Jun JA, Lee KS, Oh W, Lee JK & Jeun SS. (2008). Brain-derived neurotrophic factor stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-dependent signaling pathways. *J Neurosci Res* **86**, 2168-2178.
- Lodi R, Cooper JM, Bradley JL, Manners D, Styles P, Taylor DJ & Schapira AH. (1999). Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11492-11495.
- Lossi L, Gambino G, Ferrini F, Alasia S & Merighi A. (2009). Posttranslational regulation of BCL2 levels in cerebellar granule cells: A mechanism of neuronal survival. *Dev Neurobiol* **69**, 855-870.
- Louboutin JP, Reyes BA, Van Bockstaele EJ & Strayer DS. (2010). Gene transfer to the cerebellum. *Cerebellum* **9**, 587-597.
- Low CB, Liou YC & Tang BL. (2008). Neural differentiation and potential use of stem cells from the human umbilical cord for central nervous system transplantation therapy. *J Neurosci Res* **86**, 1670-1679.
- Lu C, Schoenfeld R, Shan Y, Tsai HJ, Hammock B & Cortopassi G. (2009). Frataxin deficiency induces Schwann cell inflammation and death. *Biochim Biophys Acta* **1792**, 1052-1061.
- Lynch DR, Perlman SL & Meier T. (2010). A phase 3, double-blind, placebo-controlled trial of idebenone in friedreich ataxia. *Arch Neurol* **67**, 941-947.
- Llorens JV, Navarro JA, Martinez-Sebastian MJ, Baylies MK, Schneuwly S, Botella JA & Molto MD. (2007). Causative role of oxidative stress in a Drosophila model of Friedreich ataxia. *FASEB J* **21**, 333-344.
- MacLean PD, Drake EC, Ross L & Barclay C. (2007). Bilirubin as an antioxidant in micelles and lipid bilayers: its contribution to the total antioxidant capacity of human blood plasma. *Free Radic Biol Med* **43**, 600-609.
- Manabe Y, Nagano I, Gazi MS, Murakami T, Shiote M, Shoji M, Kitagawa H & Abe K. (2003). Glial cell line-derived neurotrophic factor protein prevents motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* **25**, 195-200.
- Manto M & Marmolino D. (2009a). Cerebellar ataxias. *Curr Opin Neurol* **22**, 419-429.
- Manto M & Marmolino D. (2009b). Cerebellar disorders--at the crossroad of molecular pathways and diagnosis. *Cerebellum* **8**, 417-422.
- Mariotti C, Solari A, Torta D, Marano L, Fiorentini C & Di Donato S. (2003). Idebenone treatment in Friedreich patients: one-year-long randomized placebo-controlled trial. *Neurology* **60**, 1676-1679.
- Marmolino D. (2011). Friedreich's ataxia: past, present and future. *Brain Res Rev* **67**, 311-330.
- Marmolino D & Manto M. (2010). Past, present and future therapeutics for cerebellar ataxias. *Curr Neuropharmacol* **8**, 41-61.
- Martelli A, Napierala M & Puccio H. (2012). Understanding the genetic and molecular pathogenesis of Friedreich's ataxia through animal and cellular models. *Dis Model Mech* **5**, 165-176.
- Martín-Hidalgo A, Arenas MI, Sacristán S, Huerta L, Díaz-Gil JJ, Carrillo E, Gómez-Pinillos A & Lobo MV. (2007a). Rat testis localization of VEGFs and VEGF receptors in control

- and testicular regeneration stimulated by the liver growth factor (LGF). *FEBS J* **274**, 296.
- Martín-Hidalgo A, Lobo MV, Sacristán S, Huerta L, Gómez-Pinillos A, Díaz-Gil JJ & Arenas MI. (2007b). Rat testicular regeneration after Eds administration is stimulated by the liver growth factor. *FEBS J* **274**, 296.
- Martinez-Galan L, del Puerto-Nevado L, Perez-Rial S, Diaz-Gil JJ, Gonzalez-Mangado N & Peces-Barba G. (2010). [Liver growth factor improves pulmonary fibrosis secondary to cadmium administration in rats]. *Arch Bronconeumol* **46**, 20-26.
- Matsuzaki H, Tamatani M, Mitsuda N, Namikawa K, Kiyama H, Miyake S & Tohyama M. (1999). Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J Neurochem* **73**, 2037-2046.
- Mayani H & Lansdorp PM. (1998). Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* **16**, 153-165.
- Mayer M. (2000). Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clin Chem* **46**, 1723-1727.
- McAlhany RE, Jr., West JR & Miranda RC. (1997). Glial-derived neurotrophic factor rescues calbindin-D28k-immunoreactive neurons in alcohol-treated cerebellar explant cultures. *J Neurobiol* **33**, 835-847.
- Meier T & Buyse G. (2009). Idebenone: an emerging therapy for Friedreich ataxia. *J Neurol* **256 Suppl 1**, 25-30.
- Miranda CJ, Santos MM, Ohshima K, Smith J, Li L, Bunting M, Cossee M, Koenig M, Sequeiros J, Kaplan J & Pandolfo M. (2002). Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett* **512**, 291-297.
- Mittelbronn M, Schittenhelm J, Bakos G, de Vos RA, Wehrmann M, Meyermann R & Burk K. (2010). CD8(+)/perforin/granzyme B(+) effector cells infiltrating cerebellum and inferior olives in gluten ataxia. *Neuropathology* **30**, 92-96.
- More SV, Kumar H, Kim IS, Song SY & Choi DK. (2013). Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mediators Inflamm* **2013**, 952375.
- Moseley ML, Benzow KA, Schut LJ, Bird TD, Gomez CM, Barkhaus PE, Blindauer KA, Labuda M, Pandolfo M, Koob MD & Ranum LP. (1998). Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. *Neurology* **51**, 1666-1671.
- Mullen RJ, Eicher EM & Sidman RL. (1976). Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 208-212.
- Napoli E, Morin D, Bernhardt R, Buckpitt A & Cortopassi G. (2007). Hemin rescues adrenodoxin, heme a and cytochrome oxidase activity in frataxin-deficient oligodendrogloma cells. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 773-780.
- Napoli E, Taroni F & Cortopassi GA. (2006). Frataxin, iron-sulfur clusters, heme, ROS, and aging. *Antioxid Redox Signal* **8**, 506-516.
- Narantuya D, Nagai A, Sheikh AM, Masuda J, Kobayashi S, Yamaguchi S & Kim SU. (2010). Human microglia transplanted in rat focal ischemia brain induce neuroprotection and behavioral improvement. *PLoS One* **5**, e11746.
- Nayar B, Raju GM & Deka D. (2002). Hematopoietic stem/progenitor cell harvesting from umbilical cord blood. *Int J Gynaecol Obstet* **79**, 31-32.

- Nikolic WV, Hou H, Town T, Zhu Y, Giunta B, Sanberg CD, Zeng J, Luo D, Ehrhart J, Mori T, Sanberg PR & Tan J. (2008). Peripherally administered human umbilical cord blood cells reduce parenchymal and vascular beta-amyloid deposits in Alzheimer mice. *Stem Cells Dev* **17**, 423-439.
- Noshita N, Lewen A, Sugawara T & Chan PH. (2001). Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 1442-1450.
- Nunzi MG, Birnstiel S, Bhattacharyya BJ, Slater NT & Mugnaini E. (2001). Unipolar brush cells form a glutamatergic projection system within the mouse cerebellar cortex. *J Comp Neurol* **434**, 329-341.
- Pandolfo M. (2009). Friedreich ataxia: the clinical picture. *J Neurol* **256 Suppl 1**, 3-8.
- Pandolfo M & Hausmann L. (2013). Deferiprone for the treatment of Friedreich's ataxia. *J Neurochem* **126 Suppl 1**, 142-146.
- Pandolfo M & Pastore A. (2009). The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *J Neurol* **256 Suppl 1**, 9-17.
- Park DH, Eve DJ, Chung YG & Sanberg PR. (2010). Regenerative medicine for neurological disorders. *ScientificWorldJournal* **10**, 470-489.
- Parkinson MH, Boesch S, Nachbauer W, Mariotti C & Giunti P. (2013). Clinical features of Friedreich's ataxia: classical and atypical phenotypes. *J Neurochem* **126 Suppl 1**, 103-117.
- Pastore A, Tozzi G, Gaeta LM, Bertini E, Serafini V, Di Cesare S, Bonetto V, Casoni F, Carrozzo R, Federici G & Piemonte F. (2003). Actin glutathionylation increases in fibroblasts of patients with Friedreich's ataxia: a potential role in the pathogenesis of the disease. *J Biol Chem* **278**, 42588-42595.
- Paxinos G & Watson C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, CA.
- Peretz S, Jensen R, Baserga R & Glazer PM. (2001). ATM-dependent expression of the insulin-like growth factor-I receptor in a pathway regulating radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1676-1681.
- Perez-Crespo M, Pericuesta E, Perez-Cerezales S, Arenas MI, Lobo MV, Diaz-Gil JJ & Gutierrez-Adan A. (2011). Effect of liver growth factor on both testicular regeneration and recovery of spermatogenesis in busulfan-treated mice. *Reprod Biol Endocrinol* **9**, 21.
- Perlman SL. (2000). Cerebellar Ataxia. *Curr Treat Options Neurol* **2**, 215-224.
- Perlstein TS, Pande RL, Beckman JA & Creager MA. (2008). Serum total bilirubin level and prevalent lower-extremity peripheral arterial disease: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999 to 2004. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 166-172.
- Piemonte F, Pastore A, Tozzi G, Tagliacozzi D, Santorelli FM, Carrozzo R, Casali C, Damiano M, Federici G & Bertini E. (2001). Glutathione in blood of patients with Friedreich's ataxia. *Eur J Clin Invest* **31**, 1007-1011.
- Pineda M, Arpa J, Montero R, Aracil A, Dominguez F, Galvan M, Mas A, Martorell L, Sierra C, Brandi N, Garcia-Arumi E, Rissech M, Velasco D, Costa JA & Artuch R. (2008). Idebenone treatment in paediatric and adult patients with Friedreich ataxia: long-term follow-up. *Eur J Paediatr Neurol* **12**, 470-475.
- Polazzi E & Contestabile A. (2002). Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Rev Neurosci* **13**, 221-242.

- Ponti G, Peretto P & Bonfanti L. (2008). Genesis of neuronal and glial progenitors in the cerebellar cortex of peripuberal and adult rabbits. *PLoS One* **3**, e2366.
- Prosper F, Gavira JJ, Herreros J, Rabago G, Luquin R, Moreno J, Robles JE & Redondo P. (2006). [Cell transplant and regenerative therapy with stem cells]. *An Sist Sanit Navar* **29 Suppl 2**, 219-234.
- Puccio H, Simon D, Cossee M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J, Hindelang C, Matyas R, Rustin P & Koenig M. (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* **27**, 181-186.
- Pulford BE, Whalen LR & Ishii DN. (1999). Peripherally administered insulin-like growth factor-I preserves hindlimb reflex and spinal cord noradrenergic circuitry following a central nervous system lesion in rats. *Exp Neurol* **159**, 114-123.
- Rainsford E & Reen DJ. (2002). Interleukin 10, produced in abundance by human newborn T cells, may be the regulator of increased tolerance associated with cord blood stem cell transplantation. *Br J Haematol* **116**, 702-709.
- Ramirez RL, Qian J, Santambrogio P, Levi S & Koeppen AH. (2012). Relation of cytosolic iron excess to cardiomyopathy of Friedreich's ataxia. *Am J Cardiol* **110**, 1820-1827.
- Rao JS, Kellom M, Kim HW, Rapoport SI & Reese EA. (2012). Neuroinflammation and synaptic loss. *Neurochem Res* **37**, 903-910.
- Reimers D, Gonzalo-Gobernado R, Herranz AS, Osuna C, Asensio MJ, Baena S, Rodriguez M & Bazan E. (2008). Driving neural stem cells towards a desired phenotype. *Curr Stem Cell Res Ther* **3**, 247-253.
- Reimers D, Herranz AS, Diaz-Gil JJ, Lobo MV, Paino CL, Alonso R, Asensio MJ, Gonzalo-Gobernado R & Bazan E. (2006). Intrastratial infusion of liver growth factor stimulates dopamine terminal sprouting and partially restores motor function in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Histochem Cytochem* **54**, 457-465.
- Reimers D, Osuna C, Gonzalo-Gobernado R, Herranz AS, Diaz-Gil JJ, Jimenez-Escrig A, Asensio MJ, Miranda C, Rodriguez-Serrano M & Bazan E. (2012). Liver growth factor promotes the survival of grafted neural stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Curr Stem Cell Res Ther* **7**, 15-25.
- Remy S, Naveilhan P, Paille V, Brachet P & Neveu I. (2003). Lipopolysaccharide and TNFalpha regulate the expression of GDNF, neurturin and their receptors. *Neuroreport* **14**, 1529-1534.
- Richardson DR, Huang ML, Whitnall M, Becker EM, Ponka P & Suryo Rahmanto Y. (2010). The ins and outs of mitochondrial iron-loading: the metabolic defect in Friedreich's ataxia. *J Mol Med (Berl)* **88**, 323-329.
- Richerson GB & Wu Y. (2003). Dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore. *J Neurophysiol* **90**, 1363-1374.
- Richerson GB & Wu Y. (2004). Role of the GABA transporter in epilepsy. *Adv Exp Med Biol* **548**, 76-91.
- Rivest S. (2011). The promise of anti-inflammatory therapies for CNS injuries and diseases. *Expert Rev Neurother* **11**, 783-786.
- Rizzo F, Riboldi G, Salani S, Nizzardo M, Simone C, Corti S & Hedlund E. (2014). Cellular therapy to target neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Mol Life Sci* **71**, 999-1015.
- Rosenblad C, Kirik D, Devaux B, Moffat B, Phillips HS & Bjorklund A. (1999). Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial

- lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. *Eur J Neurosci* **11**, 1554-1566.
- Rotig A, de Lonlay P, Chretien D, Foury F, Koenig M, Sidi D, Munnich A & Rustin P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* **17**, 215-217.
- Rouault TA & Tong WH. (2008). Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease. *Trends Genet* **24**, 398-407.
- Rowe DD, Leonardo CC, Recio JA, Collier LA, Willing AE & Pennypacker KR. (2012). Human umbilical cord blood cells protect oligodendrocytes from brain ischemia through Akt signal transduction. *J Biol Chem* **287**, 4177-4187.
- Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, Berkowitz RL, Cabbad M, Dobrila NL, Taylor PE, Rosenfield RE & Stevens CE. (1998). Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* **339**, 1565-1577.
- Rustin P. (2003). The use of antioxidants in Friedreich's ataxia treatment. *Expert Opin Investig Drugs* **12**, 569-575.
- Rustin P, von Kleist-Retzow JC, Chantrel-Groussard K, Sidi D, Munnich A & Rotig A. (1999). Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet* **354**, 477-479.
- Sacca F, Piro R, De Michele G, Acquaviva F, Antenora A, Carlomagno G, Coccozza S, Denaro A, Guacci A, Marsili A, Perrotta G, Puorro G, Cittadini A & Filla A. (2011). Epoetin alfa increases frataxin production in Friedreich's ataxia without affecting hematocrit. *Mov Disord* **26**, 739-742.
- Saha K & Jaenisch R. (2009). Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* **5**, 584-595.
- Sailer A & Houlden H. (2012). Recent advances in the genetics of cerebellar ataxias. *Curr Neurol Neurosci Rep* **12**, 227-236.
- Sanberg PR, Eve DJ, Willing AE, Garbuzova-Davis S, Tan J, Sanberg CD, Allickson JG, Cruz LE & Borlongan CV. (2011). The treatment of neurodegenerative disorders using umbilical cord blood and menstrual blood-derived stem cells. *Cell Transplant* **20**, 85-94.
- Sanchez-Ramos JR. (2002). Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* **69**, 880-893.
- Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, Stedeford T, Chopp M & Sanberg PR. (2001). Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* **171**, 109-115.
- Sanders EJ, Parker E & Harvey S. (2008). Growth hormone-mediated survival of embryonic retinal ganglion cells: signaling mechanisms. *Gen Comp Endocrinol* **156**, 613-621.
- Santos MM, Ohshima K & Pandolfo M. (2001). Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. *Hum Mol Genet* **10**, 1935-1944.
- Sasaki T, Kitagawa K, Yagita Y, Sugiura S, Omura-Matsuoka E, Tanaka S, Matsushita K, Okano H, Tsujimoto Y & Hori M. (2006). Bcl2 enhances survival of newborn neurons in the normal and ischemic hippocampus. *J Neurosci Res* **84**, 1187-1196.
- Schmitz-Hubsch T, Fimmers R, Rakowicz M, Rola R, Zdzenicka E, Fancellu R, Mariotti C, Linnemann C, Schols L, Timmann D, Filla A, Salvatore E, Infante J, Giunti P, Labrum R, Kremer B, van de Warrenburg BP, Baliko L, Melegh B, Depondt C, Schulz J, du

- Montcel ST & Klockgether T. (2010). Responsiveness of different rating instruments in spinocerebellar ataxia patients. *Neurology* **74**, 678-684.
- Schmucker S & Puccio H. (2010). Understanding the molecular mechanisms of Friedreich's ataxia to develop therapeutic approaches. *Hum Mol Genet* **19**, R103-110.
- Schmued LC & Hopkins KJ. (2000). Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* **874**, 123-130.
- Schulte-Herbruggen O, Nassenstein C, Lommatzsch M, Quarcoo D, Renz H & Braun A. (2005). Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. *J Neuroimmunol* **160**, 204-209.
- Schulz JB, Dehmer T, Schols L, Mende H, Hardt C, Vorgerd M, Burk K, Matson W, Dichgans J, Beal MF & Bogdanov MB. (2000). Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology* **55**, 1719-1721.
- Schwaller B, Meyer M & Schiffmann S. (2002). 'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum* **1**, 241-258.
- Seoane A, Apps R, Balbuena E, Herrero L & Llorens J. (2005). Differential effects of trans-crotononitrile and 3-acetylpyridine on inferior olive integrity and behavioural performance in the rat. *Eur J Neurosci* **22**, 880-894.
- Shan Y, Schoenfeld RA, Hayashi G, Napoli E, Akiyama T, Iodi Carstens M, Carstens EE, Pook MA & Cortopassi GA. (2013). Frataxin deficiency leads to defects in expression of antioxidants and Nrf2 expression in dorsal root ganglia of the Friedreich's ataxia YG8R mouse model. *Antioxid Redox Signal* **19**, 1481-1493.
- Shi J, Ma Y, Zheng M, Ruan Z, Liu J, Tian S, Zhang D, He X & Li G. (2012). Effect of sub-acute exposure to acrylamide on GABAergic neurons and astrocytes in weaning rat cerebellum. *Toxicol Ind Health* **28**, 10-20.
- Siltanen A, Kitabayashi K, Patila T, Ono M, Tikkanen I, Sawa Y, Kankuri E & Harjula A. (2011). Bcl-2 improves myoblast sheet therapy in rat chronic heart failure. *Tissue Eng Part A* **17**, 115-125.
- Sillitoe RV & Joyner AL. (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 549-577.
- Simon D, Seznec H, Gansmuller A, Carelle N, Weber P, Metzger D, Rustin P, Koenig M & Puccio H. (2004). Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J Neurosci* **24**, 1987-1995.
- Singh J & Bowers LD. (1986). Quantitative fractionation of serum bilirubin species by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **380**, 321-330.
- Sohn YS, Breuer W, Munnich A & Cabantchik ZI. (2008). Redistribution of accumulated cell iron: a modality of chelation with therapeutic implications. *Blood* **111**, 1690-1699.
- Somoza B, Abderrahim F, Gonzalez JM, Conde MV, Arribas SM, Starcher B, Regadera J, Fernandez-Alfonso MS, Diaz-Gil JJ & Gonzalez MC. (2006). Short-term treatment of spontaneously hypertensive rats with liver growth factor reduces carotid artery fibrosis, improves vascular function, and lowers blood pressure. *Cardiovasc Res* **69**, 764-771.
- Song JH, Wang CX, Song DK, Wang P, Shuaib A & Hao C. (2005). Interferon gamma induces neurite outgrowth by up-regulation of p35 neuron-specific cyclin-dependent

- kinase 5 activator via activation of ERK1/2 pathway. *J Biol Chem* **280**, 12896-12901.
- Soragni E, Xu C, Plasterer HL, Jacques V, Rusche JR & Gottesfeld JM. (2012). Rationale for the development of 2-aminobenzamide histone deacetylase inhibitors as therapeutics for Friedreich ataxia. *J Child Neurol* **27**, 1164-1173.
- Stocker R. (2004). Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal* **6**, 841-849.
- Streit WJ. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* **40**, 133-139.
- Surra JC, Guillen N, Barranquero C, Arbones-Mainar JM, Navarro MA, Gascon S, Arnal C, Godino J, Guzman MA, Diaz-Gil JJ & Osada J. (2010). Sex-dependent effect of liver growth factor on atherosclerotic lesions and fatty liver disease in apolipoprotein E knockout mice. *Histol Histopathol* **25**, 609-618.
- Sutak R, Xu X, Whitnall M, Kashem MA, Vyoral D & Richardson DR. (2008). Proteomic analysis of hearts from frataxin knockout mice: marked rearrangement of energy metabolism, a response to cellular stress and altered expression of proteins involved in cell structure, motility and metabolism. *Proteomics* **8**, 1731-1741.
- Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K & Nakata Y. (2004). Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci* **24**, 1-7.
- Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, Ogawa S, Okado H, Miyake S, Mizuno T & Tohyama M. (1999). Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem* **274**, 8531-8538.
- Tenzen T, Zembowicz F & Cowan CA. (2010). Genome modification in human embryonic stem cells. *J Cell Physiol* **222**, 278-281.
- Tietze F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* **27**, 502-522.
- Todaro AM, Pafumi C, Pernicone G, Munda S, Pilastro MR, Russo A, Farina M & Messina A. (2000). Haematopoietic progenitors from umbilical cord blood. *Blood Purif* **18**, 144-147.
- Tolbert DL & Clark BR. (2003). GDNF and IGF-I trophic factors delay hereditary Purkinje cell degeneration and the progression of gait ataxia. *Exp Neurol* **183**, 205-219.
- Tomassini B, Arcuri G, Fortuni S, Sandi C, Ezzatizadeh V, Casali C, Condo I, Malisan F, Al-Mahdawi S, Pook M & Testi R. (2012). Interferon gamma upregulates frataxin and corrects the functional deficits in a Friedreich ataxia model. *Hum Mol Genet* **21**, 2855-2861.
- Torres-Aleman I. (2000). Serum growth factors and neuroprotective surveillance: focus on IGF-1. *Mol Neurobiol* **21**, 153-160.
- Torres-Aleman I, Barrios V, Lledo A & Berciano J. (1996). The insulin-like growth factor I system in cerebellar degeneration. *Ann Neurol* **39**, 335-342.
- Torres-Aleman I, Pons S & Garcia-Segura LM. (1991). Climbing fiber deafferentation reduces insulin-like growth factor I (IGF-I) content in cerebellum. *Brain Res* **564**, 348-351.
- Trupp M, Belluardo N, Funakoshi H & Ibanez CF. (1997). Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-

- oncogene, and GDNF receptor- α indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J Neurosci* **17**, 3554-3567.
- Tsai CL & Barondeau DP. (2010). Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* **49**, 9132-9139.
- Vendrame M, Gemma C, de Mesquita D, Collier L, Bickford PC, Sanberg CD, Sanberg PR, Pennypacker KR & Willing AE. (2005). Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. *Stem Cells Dev* **14**, 595-604.
- Vogel MW, Caston J, Yuzaki M & Mariani J. (2007). The Lurcher mouse: fresh insights from an old mutant. *Brain Res* **1140**, 4-18.
- Walter JT, Alvina K, Womack MD, Chevez C & Khodakhah K. (2006). Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia. *Nat Neurosci* **9**, 389-397.
- Werther GA, Haynes K & Johnson GR. (1990). Insulin-like growth factors promote DNA synthesis and support cell viability in fetal hemopoietic tissue by paracrine mechanisms. *Growth Factors* **3**, 171-179.
- Willing AE, Lixian J, Milliken M, Poulos S, Zigova T, Song S, Hart C, Sanchez-Ramos J & Sanberg PR. (2003). Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res* **73**, 296-307.
- Wine RN, McPherson CA & Harry GJ. (2009). IGF-1 and pAKT signaling promote hippocampal CA1 neuronal survival following injury to dentate granule cells. *Neurotox Res* **16**, 280-292.
- Yang WZ, Zhang Y, Wu F, Zhang M, Cho SC, Li CZ, Li SH, Shu GJ, Sheng YX, Zhao N, Tang Y, Jiang S, Gandjian M, Ichim TE & Hu X. (2011). Human umbilical cord blood-derived mononuclear cell transplantation: case series of 30 subjects with hereditary ataxia. *J Transl Med* **9**, 65.
- Ye P, Xing Y, Dai Z & D'Ercole AJ. (1996). In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain Res Dev Brain Res* **95**, 44-54.
- Zhang D, Hu X, Qian L, O'Callaghan JP & Hong JS. (2010). Astroglia in CNS pathologies: is there a role for microglia? *Mol Neurobiol* **41**, 232-241.
- Zhang H & Yee D. (2004). The therapeutic potential of agents targeting the type I insulin-like growth factor receptor. *Expert Opin Investig Drugs* **13**, 1569-1577.
- Zhang MJ, Sun JJ, Qian L, Liu Z, Zhang Z, Cao W, Li W & Xu Y. (2011). Human umbilical mesenchymal stem cells enhance the expression of neurotrophic factors and protect ataxic mice. *Brain Res* **1402**, 122-131.
- Zhao Y, Wang H & Mazzone T. (2006). Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics. *Exp Cell Res* **312**, 2454-2464.
- Zheng WH & Quirion R. (2006). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induces the activation/phosphorylation of Akt kinase and cAMP response element-binding protein (CREB) by activating different signaling pathways in PC12 cells. *BMC Neurosci* **7**, 51.
- Zhou Y & Danbolt NC. (2013). GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**, 165.
- Zigova T, Song S, Willing AE, Hudson JE, Newman MB, Saporta S, Sanchez-Ramos J & Sanberg PR. (2002). Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. *Cell Transplant* **11**, 265-274.

- Zoghbi HY. (2000). Spinocerebellar ataxias. *Neurobiol Dis* **7**, 523-527.
- Zola H, Fusco M, Macardle PJ, Flego L & Robertson D. (1995). Expression of cytokine receptors by human cord blood lymphocytes: comparison with adult blood lymphocytes. *Pediatr Res* **38**, 397-403.
- Zwart I, Hill AJ, Al-Allaf F, Shah M, Girdlestone J, Sanusi AB, Mehmet H, Navarrete R, Navarrete C & Jen LS. (2009). Umbilical cord blood mesenchymal stromal cells are neuroprotective and promote regeneration in a rat optic tract model. *Exp Neurol* **216**, 439-448.

